

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 4, № 2
2019**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 4, № 2
2019**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 4, No. 2, 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, № 2, 2019

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Н.Н. Сажина, Н.П. Пальмина, И.Г. Плащина, А.С. Антипова, М.Г. Семенова**
Иницированное окисление фосфатидилхолиновых липосом и изменение их физико-химических характеристик в процессе окисления.....151
- В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко**
К вопросу о молекулярных механизмах действия магнитных условий (нулевые и комбинированные магнитные поля) на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах.....160
- А.В. Вершубский, А.Н. Тихонов**
Математическое моделирование регуляции световых стадий окислительного фотосинтеза 168
- В.И. Горбач, И.М. Ермак, В.Н. Давыдова**
Покрывание липосом хитозаном и их мукоадгезивные свойства.....178
- Н.А. Касьяненко, М.С. Варшавский, Г.С. Симанов, В.М. Бакулев**
Интеграция ДНК с наночастицами серебра.....182
- Р.М. Багиров, Е.Ю. Боброва, Х.О. Гафарова, Г.А. Турабова, О.Ш. Багирова**
Связывание ионов железа с меланинами растительного происхождения.....190
- Н.В. Шейкина, Н.И. Богатина, А.С. Линик**
The Threshold Value of the Static Magnetic Field Induction for Gravitropic Reaction Depends Essentially on the Relative Direction of Static Magnetic Field and Roots of Plants 195
- Н.И. Богатина, Н.В. Шейкина, А.С. Линик**
Influence of Phase Transition of Near Membrane Water on Gravitropic Reaction of Plants in Different Combination of Magnetic and Electric Fields.....201

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- С.В. Аксенова, А.С. Батова, А.Н. Бугай, Э.Б. Душанов**
Влияние мутантных форм синаптических рецепторов NMDA на осцилляции в нейронных сетях 209
- М. Батмунх, Л. Баярчимэг, А.Н. Бугай, О. Лхагва**
Компьютерное моделирование формирования повреждений ДНК в нервных клетках при воздействии тяжелых заряженных частиц.....214
- Ю.К. Куценко, А.В. Беляев**
Компьютерное моделирование конформационных изменений и механической активации фактора фон Виллебранда в сдвиговом потоке вязкой жидкости 220

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

И.В. Жигачева, Н.И. Крикунова, И.Ф. Русина, М.М. Расулов Адаптогенные свойства ресвератрола.....	226
П.П. Зак, Ю.С. Петронюк, Е.А. Храмцова, Н.Н. Трофимова, А.Н. Мисяков, Т.С. Гурьева, О.А. Дадашева, В.М. Левин Акустико-микроскопическая визуализация структур глаза японского перепела <i>Coturnix japonica</i>	233
Ю.М. Гармаза, Г.П. Зубрицкая, Е.И. Слобожанина Спектрально-люминесцентные характеристики комплексов амилоидных структур с белками крови	237
О.М. Алексеева, А.В. Кременцова, А.В. Кривандин, О.В. Шаталова, А.Н. Голощапов, Ю.А. Ким Модельные мембранные объекты для исследований действия эндогенных и экзогенных факторов	245
Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, А.В. Вчерашняя, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, С.Н. Черенкевич Антиоксидантная и противоопухолевая активность новых синтетических серосодержащих монофенолов.....	253
В.Н. Корнеев, В.А. Шлектарёв, А.В. Забелин, Н.Ф. Ланина, Б.П. Толочко, А.А. Вазина Инструментально-методические разработки для исследования биологических структур с использованием синхротронного излучения.....	259
А.В. Ерофеев, А.А. Аносов, А.Д. Мансфельд, А.А. Шаракшанэ, М.И. Щербаков Измерение внутренней температуры тела человека методом пассивной акустической термометрии.....	270
К.Д. Казаринов, О.А. Баранова, В.А. Щелконогов, А.В. Чеканов Изучение действия КВЧ облучения на клетки крови человека	278
О.В. Слатинская, Г.В. Максимов Динамика изменения конформации свободного и внутриклеточного гемоглобина при температурном воздействии	283

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

С.А. Романенко, Р.Г. Геворгиз Конструктивные особенности портативных фотобиореакторов для микроводорослей	289
О.С. Завьялова, О.Р. Ластовенко, В.А. Лисютин, В.Л. Лучин, Н.В. Петренко, О.В. Рогова, К.А. Рыбакова, А.А. Ярошенко Лабораторный комплекс для измерения проницаемости почв виноградников	295
А.Е. Гасанова Modification mechanisms of electrophysiological characteristics of <i>Chara fragilis</i> cells under the influence of gamma rays and extracts of phytoprotectors	300

CONTENTS

Volume 4, No. 2, 2019

GENERAL BIOPHYSICS

- N.N. Sazhina, N.P. Palmina, I.G. Plashchina, A.S. Antipova, M.G. Semenova**
The initiated oxidation of phosphatidylcholine liposomes and change of their physical and chemical characteristics in the course of oxidation.....151
- V.V. Novikov, E.V. Yablokova, E.E. Fesenko**
On molecular mechanisms of the effect of magnetic conditions (zero and combined magnetic fields) on the production of reactive oxygen species in neutrophils.....160
- A.V. Vershubskii, A.N. Tikhonov**
Mathematical modeling of the light-induced processes regulation of oxygenic photosynthesis.....168
- V.I. Gorbach, I.M. Yermak, V.N. Davydova**
Coating liposomes with chitosan and their mucoadhesive properties 178
- N.A. Kasyanenko, M.S. Varshavskii, G.C. Simanov, V.M. Bakulev**
DNA integration with metal nanoparticles 182
- R.M. Bagirov, E.Yu. Bobrova, H.O. Gafarova, G.A. Turabova, O.Sh. Bagirova**
The binding of iron ions with melanins of plant origin.....190
- N.V. Sheykina, N.I. Bogatina, A.S. Linnik**
The threshold value of the static magnetic field induction for gravitropic reaction depends essentially on the relative direction of static magnetic field and roots of plants.....195
- N.I. Bogatina, N.V. Sheykina, A.S. Linnik**
Influence of phase transition of near membrane water on gravitropic reaction of plants in different combination of magnetic and electric fields 201

MODELLING IN BIOPHYSICS

- S.V. Aksenova, A.S. Batova, A.N. Bugay, E.B. Dushanov**
Effect of mutant forms of synaptic NMDA receptors on oscillations in neural networks 209
- M. Batmunkh, L. Bayarchimeg, A.N. Bugay, O. Lkhagva**
Computer simulation of the DNA damage formation in neural cells under exposure to heavy charged particles 214
- Yu.K. Kushchenko, A.V. Belyaev**
Conformation change and mechanical activation of von willebrand factor protein in a shear flow of viscous fluid studied by computer simulations 220

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY**I.V. Zhigacheva, N.I. Krikunova, I.F. Rusina, M.M. Rasulov**

Adaptogenic properties of resveratrol..... 226

**P.P. Zak, Yu.S. Petronuk, E.A. Khramtsova, N.N. Trofimova, A.N. Misiakov,
T.S. Gurieva, O.A. Dadasheva, V.M. Levin**Acoustic-microscopic study of age-related changes in eye structures of Japanese quail
Coturnix japonica 233**Y.M. Harmaza, H.P. Zubritskaya, E.I. Slobozhanina**Spectral and luminescence characteristics of the amyloid structures complexes with blood
proteins.....237**O.M. Alekseeva, A.V. Kremontsova, A.V. Krivandin, O.V. Shatalova,
A.N. Golochshapov, Yu.A. Kim**Model membrane's objects for investigations of the endogenous and exogenous factors
actions 245**G.G. Martinovich, I.V. Martinovich, A.V. Vcherashniaya, N.K. Zenkov,
E.B. Menshchikova, S.N. Cherenkevich**

Antioxidant and anti-tumor activity of new synthetic sulfur-containing monophenols.....253

**V.N. Korneev, V.A. Shlektarev, A.V. Zabelin, N.F. Lanina, B.P. Tolochko,
A.A. Vazina**Instrumental and methodological developments for the study of biological structures using
synchrotron radiation 259**A.V. Erofeev¹, A.A. Anosov, A.A. Sharakhshane, M.I. Scherbakov, A.D. Mansfel'd**Measurement of the internal human body temperature by means of passive acoustic
thermometry 270**K.D. Kazarinov, V.A. Shchelkonogov, O.A. Baranova, A.V. Chekanov**

Studying the effect of EHF irradiation on human blood cells.....278

O.V. Slatinskaya, G.V. Maksimov

Effects of temperature on conformational dynamic of red blood cells and intact hemoglobin..... 283

ECOLOGICAL BIOPHYSICS**S.A. Romanenko, R.G. Gevorgiz**

Construction features for portable microalgae cultivators 289

**O.S. Zavjalova, O.R. Lastovenko, V.A. Lisyutin, V.L. Luchin, N.V. Petrenko,
K.A. Rybakova, O.V. Rogova, A.A. Jarochenko**

Laboratory complex for measuring permeability of soils of vineyards.....295

A.E. HasanovaModification mechanisms of electrophysiological characteristics of *Chara fragilis* cells under
the influence of gamma rays and extracts of phytoprotectors 300

ИНИЦИИРОВАННОЕ ОКИСЛЕНИЕ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ И ИЗМЕНЕНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК В ПРОЦЕССЕ ОКИСЛЕНИЯ

Сажина Н.Н., Пальмина Н.П., Плящина И.Г., Антипова А.С., Семенова М.Г.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: Natnik48s@yandex.ru
Поступила в редакцию: 19.07.2019

Аннотация. Изучена кинетика инициированного 2,2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлоридом (ААРН) окисления липосом из соевого фосфатидилхолина (ФХ) при разных температурах и с добавлением в них альфа-линоленовой кислоты (АЛК), а также ингибирования окисления этих липосом введением в них эфирного масла гвоздики (ЭМГ) и инкапсулированием их казеинатом натрия (КН). Методом динамического рассеяния света (ДСР) зарегистрирована динамика изменения размеров и z-потенциала липосом в процессе их окисления. Результаты работы показали, что инициированное ААРН окисление липосом из соевого ФХ при $T = 37^{\circ}\text{C}$ можно достаточно эффективно (на 80-90%) ингибировать фенольными соединениями ЭМГ. При повышении температуры до 60°C в 4-5 раз увеличивается скорость окисления липосом, и ингибирование образования продуктов ПОЛ существенно уменьшается. Добавление в ФХ-липосомы АЛК приводит к ускорению окисления по сравнению с ФХ-липосомами. Инкапсулирование липосом казеинатом натрия снижает окисление липосом на 70%, а совместное действие его с ЭМГ – на 90%. С повышением температуры эффективность защитной функции казеиновой оболочки уменьшается. В процессе окисления при $T = 37^{\circ}\text{C}$ размер ФХ-липосом увеличивается на 6-7%, а абсолютное значение отрицательного z-потенциала увеличивается к концу окисления примерно в 3 раза. Введение в липосомы АЛК значительно влияет на динамику изменения их размеров и z-потенциала. Присутствие в липосомах ЭМГ стабилизирует размеры и z-потенциал в процессе окисления и для ФХ-липосом, и для липосом с АЛК. Комплекс ФХ-липосом с казеинатом натрия также приводит к стабилизации его размеров и z-потенциала.

Ключевые слова: липосомы, ПОЛ, фосфатидилхолин, эфирное масло гвоздики, казеин натрия, альфа-линоленовая кислота.

В настоящее время большой интерес вызывают работы по созданию и исследованию липосомных структур на основе соевого фосфатидилхолина (ФХ), как наноконтейнеров для доставки в ткани и клетки живых организмов различных функциональных нутрицевтиков: незаменимых полиненасыщенных ω -3 и ω -6 жирных кислот (ПНЖК), антиоксидантов (АО), витаминов, органических кислот и др. соединений [1, 2]. Липосомы ФХ служат также моделями для изучения биохимических процессов в мембранах живых клеток, в частности перекисного окисления липидов (ПОЛ), и регулирования этого окисления различными субстанциями [3]. Благодаря наличию в ФХ ПНЖК, липосомы легко окисляются кислородом воздуха и разрушаются под воздействием света и высоких температур, поэтому требуют защиты от окисления и деградации при их длительном хранении и в разных экстремальных условиях, например, при производстве и переработке пищевых продуктов. Для предотвращения окисления, прежде всего, используют различные АО, вводимые в липосомы, среди которых перспективными являются жирорастворимые фенольные соединения, входящие в состав эфирных масел (ЭМ) пряно-ароматических растений. Было установлено [4], что при ингибировании автоокисления метиловых эфиров ПНЖК, выделенных из льняного масла, эфирными маслами 16-ти различных ароматических растений, наибольшую эффективность имеет эфирное масло гвоздики (ЭМГ). Помимо антиоксидантной защиты липосом от окисления, используют также инкапсулирование их различными биополимерами, которые не только предохраняют липосомы от окисления, но повышают их функциональность и растворимость в водной среде, что весьма важно для увеличения биодоступности содержащихся в них нутрицевтиков [5].

В представленной работе проведено изучение кинетики инициированного окисления липосом из соевого ФХ при разных температурах и с добавлением в них альфа-линоленовой кислоты (АЛК). Исследовано влияние на окисление липосом введения в них эфирного масла гвоздики (ЭМГ) и инкапсулирования их казеинатом натрия (КН). Изучена также динамика изменения размеров и z-потенциала липосом в процессе окисления и влияние на нее ингибирующих и окисляющих агентов.

Для приготовления липосом использовали суспензию соевого ФХ марки Lipoid S100 (фирмы Lipoid GmbH, Германия) в фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,2$, $I = 0,001 \text{ M}$). Состав соевого ФХ по данным фирмы Lipoid следующий: фосфолипиды, г/100г: ФХ = 94 г, N-ацил-фосфатидилэтанолламин = 0,5, фосфатидилэтанолламин = 0,1, фосфатидилинозитол = 0,1, лизофосфатидилхолин = 3; неполярные липиды, г/100г: триглицериды = 2, свободные жирные кислоты = 0,5, α -токоферол = 0,15. Соотношение жирных кислот в % к общему их количеству составило: пальмитиновая = 12-17; стеариновая = 2-5; олеиновая = 11-15; линолевая = 59-70; линоленовая = 3-7. Липосомы с концентрацией 1 мг/мл готовили из суспензии ФХ, добавляя в нее, если необходимо, ЭМГ (4,0% веса к весу ФХ) или ALA в пропорции ФХ:АЛК = 1:0,59 для достижения в липосомах соотношения α -линоленовой и линолевой кислот (ω -3: ω -6) = 1:1, учитывая жирнокислотный состав ФХ. Липосомы формировали с помощью

ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonics & Materials, США), охлаждая их смесью воды со льдом для предотвращения окисления, после чего пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя экструдер (AVANTI PolarLipid, США). Инкапсулирование липосом казеинатом натрия (КН) (Sigma) осуществляли согласно методике [5], с весовым соотношением КН:ФХ = 10:1 при концентрации ФХ в липосомах 1 мг/мл. Природный биополимер КН является натриевой формой основного белка молока, в которую входят такие индивидуальные белки, как (α_{S1} -, α_{S2} -, β - и κ -казеины), поэтому преимущества его использования в качестве наноконтейнера для ФХ липосом заключаются, кроме защиты последних от окисления, в повышении питательной ценности таких биологических наноконтейнеров. КН растворяли в том же фосфатном буфере (рН 7,2, ионная сила 1 мМ), перемешивая смесь на магнитной мешалке, затем раствор центрифугировали от примесей. Низкая ионная сила буфера была выбрана для того, чтобы при инкапсулировании были задействованы электростатические взаимодействия между противоположно заряженными функциональными группами белка и липидов. Концентрацию белка в растворе определяли методом дифференциальной рефрактометрии по известному значению инкремента показателя преломления белка. Растворы КН и липосом ФХ в фосфатном буфере смешивали в шейкере (GFL 3032, Германия) в течение 1 ч при 40°C.

Для инициирования окисления липосом использовался водорастворимый азо-инициатор ААРН с конечной концентрацией в растворе липосом 2 мМ. Окисление осуществлялось в пробирках, помещенных в термостат, при температурах 37°C и 60°C, а для измерения размеров и z-потенциала липосом в процессе их окисления из пробирок отбирались пробы окисляемых липосом. Степень развития ПОЛ регистрировали во времени по УФ-спектрам поглощения ДК при $\lambda = 233$ нм и кетодиенов (КД) при $\lambda = 274$ нм на спектрофотометре (Perkin Elmer, Lambda-25). Ошибка измерения оптической плотности (А) составила не более 3%. Погрешность определения $A-A_0$ по трем повторным измерениям не превышала $\pm 10\%$. При определении размеров липосом в растворе использовался метод ДСР - метод фотонной корреляционной спектроскопии. В этом методе проводится расчет гидродинамического диаметра сфер (D_h), которые двигались бы в жидкости с той же скоростью, что и исследуемые частицы. Измерения D_h липосом проводились на высокочувствительном приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного на липосомах под углом 173° лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм. Концентрация РС липосом составляла 1 мг/мл, температура 25°C, индекс полидисперсности (Pdl) суспензий липосом для всех измерений менялся в пределах 0,1-0,3. Для каждого размера D_h осуществлялась регистрация 5-10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями в каждом измерении, усреднение проводилось по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Так как каждый опыт по окислению повторялся 3 раза, то учитывались также ошибки для D_h при его повторных измерениях. Суммарная погрешность не превышала $\pm 5\%$. Для измерения z-потенциала (Z) липосом этот же прибор использовался в режиме регистрации электрофоретической подвижности (ЭФП) частиц. Поскольку z-потенциал связан с ЭФП, программа прибора рассчитывает и строит распределение для z-потенциала. Для всех изученных образцов липосомных суспензий спектр подвижности содержал только одну полосу. Калибровка проводилась по стандартной дисперсии полистирольного латекса с погрешностью $\pm 5\%$. Усреднение максимальных значений z-потенциала осуществлялось по трем повторным измерениям при окислении, воспроизводимость для идентичных образцов различалась в разные моменты времени окисления, но была в пределах 10%. С учетом погрешности калибровки прибора, суммарная ошибка измерений z-потенциала была не более $\pm 12\%$.

Первым этапом наших исследований было изучение процессов авто и иницированного окисления липосом из соевого ФХ в зависимости от температуры. На рисунке 1 для двух значений температур (37°C и 60°C) приведены примеры спектров поглощения липосом ФХ в различные моменты времени в процессе их иницированного окисления. При $\lambda = 233$ нм (верхние спектры) появляются характерные максимумы поглощения для ДК, в то время, как при $\lambda = 274$ нм для КД четко выраженных максимумов не наблюдается (нижние). За время наблюдения накопление КД составило менее 10% от образования ДК. Поэтому дальнейшее изучение окисления проводилось только по изменению концентрации ДК. На рисунке 2 представлена динамика изменения поглощения ДК липосом ФХ в процессе их авто (кривые 1, 2) и иницированного ААРН (кривые 3, 4) окисления при температурах 37°C (1, 3) и 60°C (2, 4). Видно, что автоокисление при 37°C развивается очень медленно (период индукции составляет 5 часов), и в течение всего остального времени наблюдения (до 10 часов) можно отметить лишь незначительное увеличение содержания ДК. Увеличение температуры ускоряет этот процесс, сокращая период индукции на кривой накопления ДК до 30 минут. Учитывая величину коэффициента молярной экстинкции ДК при $\lambda = 233$ нм, равную $274000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, можно оценить среднюю скорость формирования ДК при автоокислении. Для $T = 37^\circ\text{C}$ в течение 300 мин (от 300 до 600 мин) она составляет $0,84 \cdot 10^{-7} \text{ M}\cdot\text{мин}^{-1}$. С увеличением температуры до 60°C скорость автоокисления возрастает почти на порядок ($8,14 \cdot 10^{-7} \text{ M}\cdot\text{мин}^{-1}$ на участке кривой 2, от 40 до 200 мин). При переходе к иницированному окислению при 37 °C наблюдается немонотонный ход кривой накопления ДК, а именно, чередование ускорения и замедления окисления (кривая 3). По-видимому, это связано с наличием в соевом ФХ Lipoid S100 (фирмы Lipoid GmbH, Германия) трех основных ненасыщенных жирных кислот (ЖК): олеиновой, линолевой и линоленовой (в процентном соотношении 13 : 60 : 7 ко всем ЖК). Вероятно, они поочередно включаются в окислительный процесс в соответствии с отношением их концентраций и констант скорости окисления (1:10:15) [6]. При повышении температуры (рис. 2 кривая 4) этот эффект практически не проявляется. Исчезает и небольшой (30 мин) период индукции, который имеет место при $T = 37^\circ\text{C}$ и обусловлен не только кинетикой развития

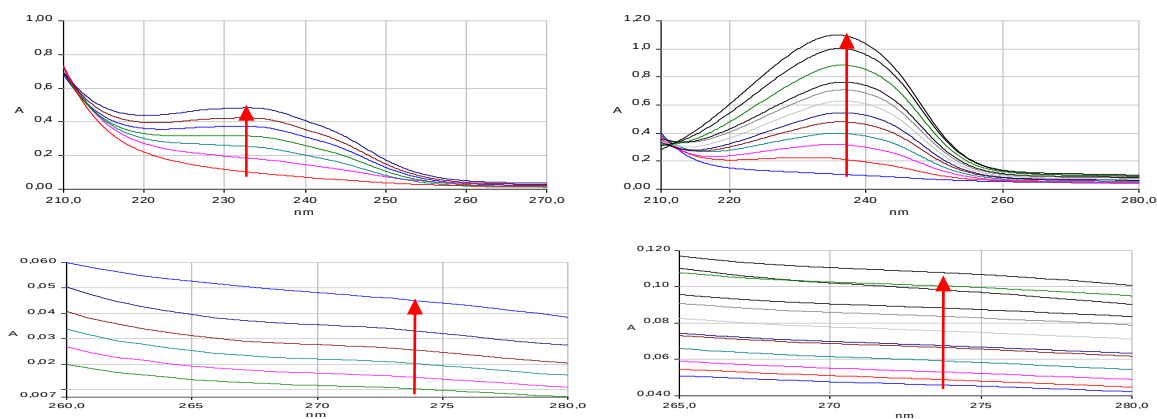


Рисунок 1. Спектры поглощения липосом ФХ (1 мг/мл) в процессе их инициированного окисления при температурах $T = 37^{\circ}\text{C}$ (слева) и 60°C (справа) для ДК ($\lambda = 233 \text{ нм}$ – верхние спектры) и для КД ($\lambda = 274 \text{ нм}$ – нижние спектры). Стрелками на рисунках обозначен временной интервал окисления от $t_0 = 0$ до $t_{\text{кон}} = 400\text{--}500 \text{ мин}$

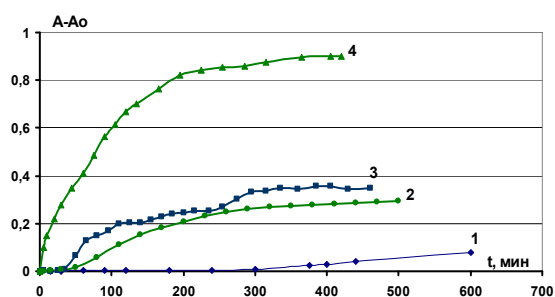


Рисунок 2. Накопление ДК в процессе окисления липосом ФХ (1мг/мл): кривые 1, 2 – автоокисление, 3, 4 – инициированное окисление при $T = 37^{\circ}\text{C}$ (1,3) и 60°C (2, 4). A_0 – оптическая плотность при $t = 0$

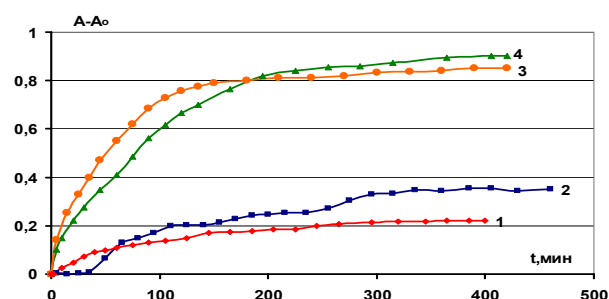


Рисунок 3. Влияние АЛК в составе липосом ФХ на их инициированное окисление: липосомы ФХ при $T = 37^{\circ}\text{C}$ (2) и 60°C (4); липосомы ФХ с АЛК (ФХ:АЛК=1:0.59) при $T = 37^{\circ}\text{C}$ (1) и 60°C (3). $[\text{ФХ} + \text{АЛК}] = 1 \text{ мг/мл}$

процесса накопления ДК, но и небольшим количеством α -токоферола (0,15-0,25 г/100г), которое исходно присутствует в препарате ФХ Lipoid S100. Процесс накопления продуктов окисления может замедлять и наличие в ФХ Lipoid S100 насыщенных ЖК (примерно 20%).

В дисперсном растворе липосом при постоянной скорости генерации радикалов инициатора ААРН при его термическом распаде, возникает радикально-цепное окисление ЖК в ФХ липосомах. Для ААРН скорость инициирования радикалов $W_i = k_i [\text{ААРН}]$, где $k_i = 1,3 \cdot 10^{13} \cdot e^{-112600/RT}$ – константа скорости инициирования. При $T = 37^{\circ}\text{C}$ $k_{i37} = 1,36 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$, при $T = 60^{\circ}\text{C}$, $k_{i60} = 27,6 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$, т.е. примерно в 20 раз больше. Согласно законам жидкофазного окисления углеводородов и липидов (ЛН) с квадратичным обрывом цепей, для скорости поглощения O_2 справедливо: $W_{\text{O}_2} = k_p / (2k_t)^{0,5} \times [\text{ЛН}] \times W_i^{0,5}$, где k_p и k_t – эффективные константы скорости продолжения и обрыва цепей окисления [7]. При сравнении кривых 3 и 4 на рисунке 2 видно, что при повышении температуры накопление ДК до постоянного уровня увеличилось примерно в 3 раза. Средняя скорость окисления липосом увеличилась в течение первых 20-30 мин от начала окисления (накопления ДК) в 4,5-5,0 раза (от $0,33 \cdot 10^{-5} \text{ М/мин}$ до $1,61 \cdot 10^{-5} \text{ М/мин}$). Главным образом, это происходит за счет значительного увеличения скорости (W_i) термической диссоциации ААРН и наработки инициирующих окисление радикалов. Допуская, что скорость накопления ДК соответствует скорости поглощения кислорода W_{O_2} , можно оценить влияние температуры на скорость окисления ФХ в липосомах и сравнить с измеренными значениями. При одинаковом значении $[\text{ААРН}]$, отношение скоростей инициирования при изученных температурах $W_{i60}/W_{i37} = k_{i60}/k_{i37} = 20$. Используя выражение для W_{O_2} и учитывая равенство $[\text{ЛН}]$, k_p и k_t , можно получить $W_{\text{O}_2}(60^{\circ}\text{C}) / W_{\text{O}_2}(37^{\circ}\text{C}) = (W_{i60}/W_{i37})^{0,5} = (20)^{0,5} \approx 4,5$, что примерно соответствует полученному соотношению скоростей накопления ДК [8].

Как указывалось выше, липосомы ФХ могут быть использованы в качестве носителя для доставки в организм незаменимых ω -3 и ω -6 ПНЖК. В связи с этим необходимо выяснить, каково влияние ПНЖК на кинетику окисления этих липосом. С этой целью мы использовали в своих экспериментах ФХ липосомы с встроенной в них ω -3 АЛК. На рисунке 3 приведена кинетика окисления липосом с добавлением в них АЛК при $T = 37^{\circ}\text{C}$ (кривая 1) и 60°C (3). Видно, что АЛК ускоряет окисление липосом на начальной стадии процесса (до 60 мин), не имея при этом периода индукции. При $T = 60^{\circ}\text{C}$ введение АЛК в липосомы значительно (в 1,5-2 раза) ускоряет окисление липосом примерно до 200 мин, затем кривые накопления ДК практически совпадают, что можно объяснить, по-видимому, полным расходом АЛК, введенной в липосомы.

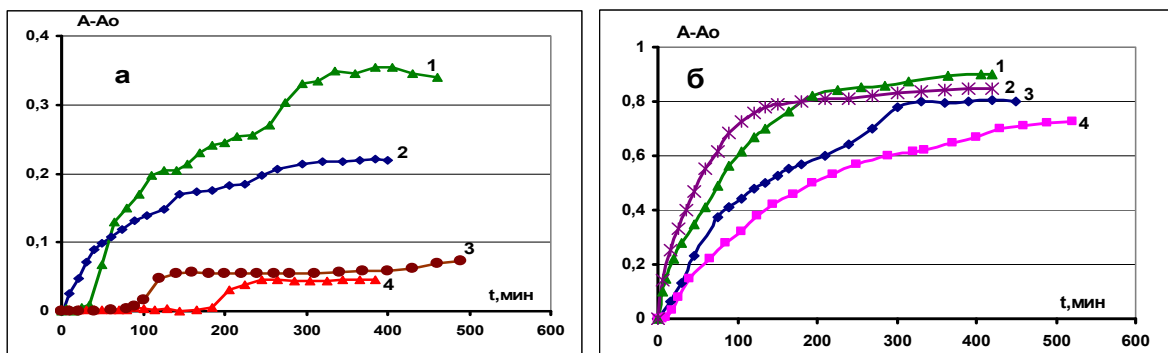


Рисунок 4. Ингибирование окисления липосом ФХ и ФХ+АЛК гвоздичным маслом (4%) при $T = 37^{\circ}\text{C}$ (а) и $T = 60^{\circ}\text{C}$ (б). Липосомы ФХ (кривые 1 на обоих рис.), ФХ+АЛК (кривые 2), ФХ+ЭМГ (кривые 4) и ФХ+АЛК+ЭМГ (кривые 3). Концентрация всех смесей 1 мг/мл

Липосомы ФХ – удобная биологическая модель для изучения антиокислительной активности природных соединений, особенно если они имеют жирорастворимую природу. К таким соединениям относятся фенольные соединения ЭМГ, которое проявляет антирадикальную активность в модельной системе с дифенилпикрилгидразином (ДФПГ), в реакции с гидроксильными радикалами действует как хелатор железа, ингибирует окисление линолевой кислоты [9]. Поэтому целесообразно было проверить его АО действие в инициированном окислении ФХ липосом. В состав ЭМГ входят по массе: эвгенол (от 70 до 85%), ацетат эвгенола (13%), кариофиллен (10%), эвгенил ацетат (5%), α -бергамотен (3%), цинеон (3%), линалоол, терпены и др. соединения, содержание которых менее 1%. Эвгенол (4-аллил-2-метоксифенол) – очень активный монофенольный антиоксидант, который определяет, главным образом, ингибирование окисления ПНЖК в ФХ липосомах [8]. Вместе с эвгенолом в ЭМГ присутствуют ненасыщенные алифатические и циклические соединения, многие из которых являются конкурентами за радикалы с ПНЖК, поэтому эффективность ЭМГ всегда выше, чем индивидуальных АО. В связи с этим можно отметить, что в нашем эксперименте при окислении липосом с ЭМГ (4% вес/вес) при $T = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 180 мин происходит полное торможение окисления ФХ эфирным маслом гвоздики, а при максимальном накопления ДК, ЭМГ снижает их концентрацию примерно в 8 раз (на 87,5%) (рис. 4а, кривые 1 и 4).

Синергетический эффект компонентов ЭМГ и пролонгированное торможение окисления важны при хранении пищевых продуктов, а также с точки зрения сохранения их антиоксидантных свойств в процессе приготовления пищи с данными пищевыми добавками. Для оценки степени сохранности антиоксидантных свойств ЭМГ при повышении температуры мы провели эксперименты по окислению липосом с ЭМГ (4% вес/вес) при $T = 60^{\circ}\text{C}$. Повышение температуры уменьшает время полного ингибирования окисления ЭМГ примерно в 18 раз (с 180 до 10 мин.) (рис. 4б кривые 1, 4), а степень снижения концентрации ДК по сравнению с контролем на протяжении всего времени окисления составила в среднем 1,5 раза (на 37,5%). Несмотря на жесткие условия окисления, антиоксидантные свойства ЭМГ сохраняются. Эффективность ингибирования окисления ЭМГ смеси ФХ+АЛК (рис. 4а, кривые 2, 3) несколько изменяется: при $T = 37^{\circ}\text{C}$ ЭМГ только в 4 раза (на 73%) снижает накопление ДК и в 2 раза уменьшает период индукции, вероятно, за счет очень активного окисления АЛК. При повышении температуры (рис. 4б) период индукции практически исчезает, а концентрация ДК в течение ингибирования ЭМГ уменьшается неравномерно (от 30 до 5%). Возможно, что понижение ингибирующей способности ЭМГ при такой температуре связано с разложением некоторых его компонентов, включая эвгенол, и потерей им антиоксидантной активности.

Как уже упоминалось, одним из способов предохранения липосом ФХ от окисления является инкапсулирование их различными гидрофильными биополимерами, которые способствуют повышению растворимости липосом ФХ в водной среде, а также сохраняют их функциональность. В нашей работе был использован природный биополимер казеинат натрия (КН) [10]. Он является натриевой формой основного белка молока, объединяющей такие индивидуальные белки, как казеины (α_{S1} -, α_{S2} -, β - и κ -). Поэтому преимущества его использования для липосом ФХ заключаются не только в защите их от окисления, но и в повышении питательной ценности таких биологических наноконтейнеров. Для исследования влияния КН на окисление ФХ липосом, была изучена кинетика ингибирования им окисления при $T = 37^{\circ}\text{C}$ и 60°C и с его одновременным действием вместе с ЭМГ (рис. 5).

При $T = 37^{\circ}\text{C}$ КН снижает максимальный уровень ДК примерно в 3,5 раза (на 70%) (рис. 5а, кривые 1, 2), а вместе с ЭМГ – в 10 раз (на 90%). При этом КН мало меняет периоды индукции окисления ФХ (кривые 1, 2) и ФХ+ЭМГ (кривые 3, 4). На основании данных о структурных параметрах комплексных частиц [11], сделан вывод, что комплексы КН с изученными липосомами ФХ представляют собой супрамолекулярные частицы с плотной структурой. Формирование такого комплекса, вероятно, препятствует диффузии кислорода к ненасыщенным углеродным связям ЖК в липосомах, и тем самым способствует их защите от окисления. С увеличением температуры ингибирующее действие КН значительно уменьшается, а периоды индукции практически исчезают

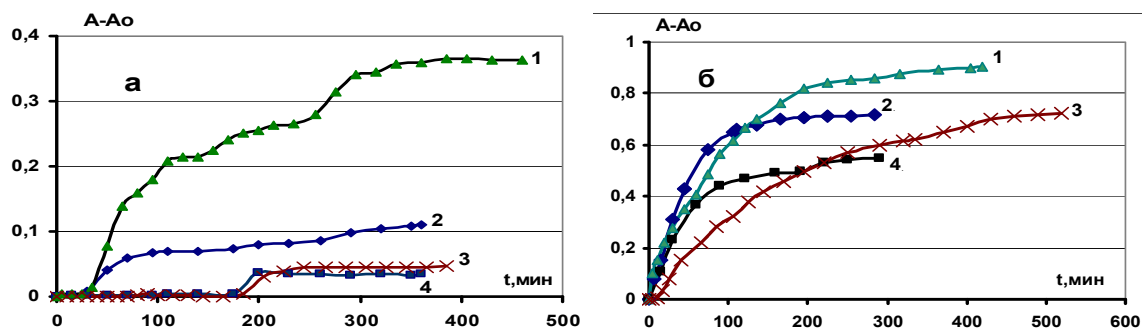


Рисунок 5. Ингибирующее действие инкапсулирования ФХ липосом КН (кривые 2 на обоих рисунках) и совместным действием его с ЭМГ (кривые 4) при $T=37^{\circ}\text{C}$ (а) и $T=60^{\circ}\text{C}$ (б). Липосомы ФХ (кривые 1) и ФХ+ЭМГ (кривые 3). $[\text{ФХ}+\text{ЭМГ}]=1\text{мг/мл}$, $\text{КН}:\text{ФХ}:\text{ЭМГ}=10:1:0,04$.

(рис. 5б, кривые 2, 4). Включение липосом в КН приводит к снижению максимального уровня ДК лишь в 1,3 раза (на 20%), а совместное использование КН с ЭМГ увеличивает этот эффект до 1,7 раза (на 40%). Снижение ингибирующего действия КН при нагревании связано, возможно, со структурными изменениями комплексов и значительной потерей ими защитных функций по отношению к окислению ФХ.

Как уже упоминалось во введении, ПНЖК фосфолипидов мембран подвергаются значительной модификации в процессе ПОЛ, что приводит к деградации липидных ацильных цепей фосфолипидов. Меняются физико-химические свойства мембран: текучесть, проницаемость, активность протеинов и др. и их важные функции, что приводит к старению клеток и появлению различных заболеваний [12]. На кинетику ПОЛ в липосомах существенно влияет структура ее липидных компонентов и их способность к созданию агрегатов, что может приводить к изменению размеров и z-потенциала (поверхностного заряда) липосом в процессе ПОЛ [13]. В свою очередь изменения заряда липосом могут влиять на кинетические характеристики их окисления [14, 15]. В настоящей работе были измерены размеры и z-потенциал липосом ФХ в процессе их инициированного окисления при $T = 37^{\circ}\text{C}$ с целью установления взаимосвязи этих параметров с изменениями концентрации продуктов ПОЛ (ДК). Было исследовано также влияние на динамику изменения размеров и z-потенциала при окислении добавления в липосомы АЛК, введения в них ЭМГ и инкапсулирования их КН.

Результаты наших экспериментов показали, что при температуре 60°C , когда при окислении липосом ФХ уровень ДК увеличился в 3 раза к концу наблюдения по сравнению с уровнем ДК при 37°C (рис. 2, кривые 2 и 4), средний размер липосом немонотонно повышался и достиг величины (260 ± 60) нм, что примерно в 1,7 раза выше исходного. Это может говорить об образовании в процессе окисления при таких условиях, кроме ДК, множества липидных конгломератов различных размеров. На рис. 6а приведена иллюстрация распределения интенсивности светорассеяния окисленных липосом ФХ при 60°C к концу окисления ($t = 360$ мин.). Видно, что в суспензии липосом образуются частицы с очень большим разбросом размеров, а ошибка измерения среднего размера составляет свыше 20%. Поэтому дальнейшее изучение динамики изменения размеров и z-потенциала мы проводили только при температуре 37°C . На рисунке 6б показаны типичные кривые распределения интенсивности по размерам липосом из ФХ+АЛК в разные моменты времени окисления при $T = 37^{\circ}\text{C}$, откуда видно, что все кривые имеют один максимум. В таблице 1 приведены размеры и z-потенциал липосом с различным составом, измеренные до их окисления, и индекс полидисперсности. Видно, что введение в липосомы

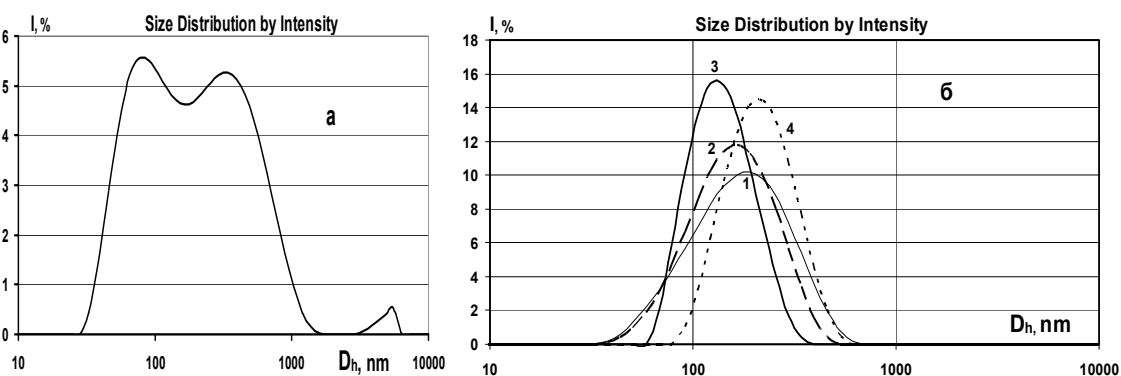


Рисунок 6. а – распределение интенсивности (I) светорассеяния окисленных липосом ФХ при $T = 60^{\circ}\text{C}$ к концу окисления ($t = 360$ мин.); б – распределения интенсивности светорассеяния по размерам липосом (D_h) для смеси ФХ+АЛК в процессе инициированного окисления при $T = 37^{\circ}\text{C}$: 1 – без ААРН, 2 – с добавлением ААРН при $t = 0$ мин, 3 – $t = 30$ мин, 4 – $t = 360$ мин

Таблица 1. Гидродинамический диаметр (D_h) и z -потенциал (Z) липосом до окисления (перед введением инициатора ААРН). Индекс полидисперсности (PDI)

Состав липосом	D_h , нм	z -потенциал (Z), мВ	PDI
ФХ	150,7±4,9	-23,1±2,2	0,227±0,012
ФХ+ЭМГ	153,2±1,8	-14,8±1,4	0,247±0,009
ФХ+АЛК	187,2±4,2	-38,6±3,5	0,197±0,005
ФХ+АЛК+ЭМГ	201,3±3,6	-32,8±3,2	0,201±0,009
ФХ+КН	204,4±6,3	-15,4±0,8	0,270±0,014

добавок и их инкапсулирование КН меняет D_h липосом и их заряд. Для ЭМГ, вероятно, молекулы липофильного эвгенола и других компонентов встраиваются в липидные слои фосфолипидов, нарушая их регулярную упаковку, что может приводить к небольшому увеличению D_h .

При внедрении в липосомы молекул АЛК, карбоксильные группы которых заряжены отрицательно и обращены к водной фазе, существенно увеличивается абсолютная величина z -потенциала (поверхностный отрицательный заряд) липосом и их средний размер. Добавление в (ФХ+АЛК) липосомы ЭМГ приводит к небольшому увеличению их размера и к уменьшению абсолютного значения Z . При капсулировании ФХ-липосом КН происходит естественное увеличение размера полученной капсулы, при этом абсолютное значение отрицательного z -потенциала уменьшается по сравнению с z -потенциалом ФХ липосом, по-видимому, за счет компенсации отрицательного заряда ближайшими к липосоме положительно заряженными группами белковой оболочки. На рисунке 7 приведена динамика изменения средних размеров (D_h) (а) и z -потенциала (Z) (б) ФХ-липосом (кривые 1), наполненных (2-4) и инкапсулированных (5) в процессе их инициированного окисления. После введения инициатора ААРН в дисперсию липосом (при $t = 0$), их D_h и z -потенциал меняются. Т.к. молекулы ААРН ($RN=NR$) заряжены положительно, то попадая в липосомы, они частично нейтрализуют отрицательный заряд поверхностных структур фосфолипидов, поэтому абсолютная величина отрицательного z -потенциала всех изученных липосом в начале окисления (рис. 7б, $t = 0$) уменьшается по сравнению с z -потенциалом до введения ААРН. Вследствие этого, вероятно, происходит перестройка фосфолипидов в бислое, и размер липосом уменьшается (рис. 7а, $t = 0$). Особенно это выражено у липосом ФХ+АЛК (кривые 3, 4, $t = 0$).

При термораспаде азоинициатора, генерации свободных радикалов (R^*) и быстрого образования пероксильных радикалов ROO^* инициатора, происходит окисление ПНЖК в липосомах, их частичная трансформация из *cis* в *trans-cis* и *trans-trans* изомерные первичные продукты окисления гидропероксиды (ДК). Эти трансформации в конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов приводят к важным изменениям в структуре липосомальной мембраны, и, как следствие, в размерах и z -потенциале липосом. Для ФХ липосом (кривая 1) D_h увеличивается примерно на 6-7% через 100-120 минут от начала окисления. К этому времени Z возрастает по абсолютной величине с -5 до -12 мВ и продолжает расти до конца окисления до -16 мВ. Ход кривой 1 на рисунке 7б напоминает зеркальное отображение хода кривой 3 на рисунке 2, т.е. изменение z -потенциала коррелирует с изменением содержания ДК. Т.к. сходство фосфолипидных молекул между собой в бислое липосом меняется в процессе окисления, меняется ориентация полярных головок фосфолипидов [3].

Происходит перегиб окисленных ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов и приближение их ООН-групп к поверхности липосомы [16]. Протекающие структурные изменения могут способствовать диссоциации этих групп, что является основной причиной увеличения отрицательного заряда на поверхности липосом. При этом при таких концентрациях ДК общий объем трансформированных окисленных фосфолипидов увеличивается недостаточно. Это свидетельствует о том, что при физиологической температуре в процессе окисления размеры липосом меняются незначительно, и зависимости (корреляции) размера от концентрации ДК не наблюдается.

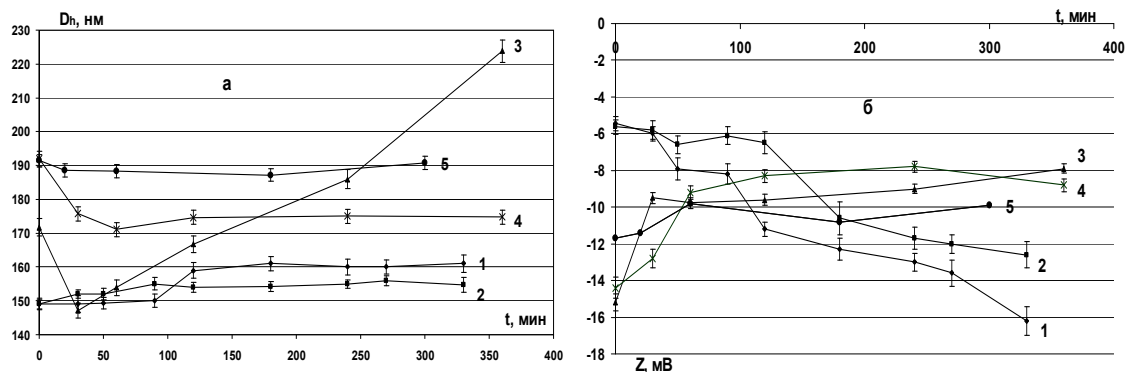


Рисунок 7. Динамика изменения среднего гидродинамического диаметра D_h (а) и z -потенциала Z (б) в процессе инициированного окисления: 1 – ФХ-липосом, 2 – с ЭМГ (ФХ:ЭМГ = 1:0,04), 3 – с АЛК (ФХ:АЛК = 1:0,59), 4 – с АЛК+ЭМГ (ФХ:АЛК:ЭМГ=1:0,59:0,04), 5 – с КН (ФХ:КН = 1:10). [ФХ] = [ФХ+ЭМГ] = [ФХ+АЛК] = [ФХ+АЛК+ЭМГ] = 1 мг/мл, [ААРН] = 2 мМ, $T = 37^\circ\text{C}$.

Присутствие в ФХ-липосомах ЭМГ (кривая 2) несколько замедляет рост абсолютной величины отрицательного поверхностного заряда липосом примерно до 120 минут, после чего он возрастает, не достигая, однако, заряда исходных липосом. Размер липосом в течение всего времени окисления в этом случае «стабилизируется» и практически не меняется. Для липосом ФХ+АЛК в течение первых 30-40 минут размер липосом снижается с 170 до 150 нм, а абсолютная величина z-потенциала падает от -15 до -10 мВ (кривые 3 на рис. 7). Это время совпадает с полным окислением АЛК (кривая 2, рис 4), а далее продолжается окисление ПНЖК в оставшемся ФХ. В процессе дальнейшего окисления липосом происходит значительное (до 220 нм) увеличение их размера, вероятно, не только из-за постепенного накопления ДК, но и за счет образования больших образований ДК с остатками окисленных АЛК. Поверхностный заряд и z-потенциал остаются практически на одном уровне (около -10 мВ). Присутствие в (ФХ+АЛК) липосомах ЭМГ значительно ингибирует окисление АЛК в течение 100 мин. (кривая 3, рис.4), и разброс изменения D_h и z-потенциала существенно сглаживается – эти параметры остаются практически неизменными в процессе дальнейшего окисления липосом (кривые 4 на рис. 7). Как было отмечено ранее, при окислении липосом и наработки гидроперекисей в гидрофобных хвостах жирных кислот ФХ появляются гидрофильные перекисные группы, которые влияют на перестройку структуры бислоя. В работе [17] методом малоуглового рентгеновского рассеяния проведена оценка изменения толщины и структуры бислоя больших одноламеллярных везикул и места локализации гидропероксидных и карбоксильных групп при различных соотношениях в бислое неокисленных фосфолипидов POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и двух видов окисленных: POPC-ООН и Paze-PC (1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocoline). Было установлено, что 95% гидроперекисных групп находятся в полярной области мембраны вблизи карбонильных групп практически для всех соотношений фосфолипидов. Средняя молекулярная площадь постепенно увеличивается от $65 \text{ \AA}^2$ для POPC-бислоев до $78 \text{ \AA}^2$ для бислоев POPC-ООН, в то время как толщина окисленной мембраны становится тоньше не окисленной. В нашей работе, при окислении смеси ФХ+АЛК со сложным составом ФХ возможно образование различных, меняющихся во времени, агрегатных частиц из смеси окисленных и не окисленных ФХ, остатков АЛК и промежуточных субстанций, что приводит к увеличению среднего размера липосом, уменьшению и стабилизации абсолютной величины отрицательного z-потенциала.

При инкапсулировании исходных ФХ-липосом в КН, за счет эффективного ингибирования окисления белковой оболочкой (кривая 2, рис. 5) размер липосом практически остается на начальном уровне (190 нм) в течение всего процесса окисления, несмотря на накопление некоторого количества ДК. Величина отрицательного заряда «капсулы» немного уменьшается в начале окисления, а далее z-потенциал остается на уровне -10 мВ до конца окисления (рис. 7б, кривая 5). Т.о., белковая оболочка не только заметно предохраняет ПНЖК фосфолипидов липосом от окисления, но и стабилизирует размер и z-потенциал этой липосомно-белковой структуры. В [18] методом калориметрии смешения был установлен преобладающий вклад электростатического взаимодействия между КН и ФХ-липосомами в формировании комплексных частиц в нейтральной области pH. На основании таких данных о структурных параметрах комплексных частиц как: молярная масса, размер, форма и плотность частиц, измеренных методом ДСР, был сделан вывод, что эти комплексы представляют собой супрамолекулярные частицы с плотной структурой. Это, по-видимому, препятствует диффузии кислорода к ненасыщенным углеродным связям ПНЖК в липосомах, и способствует снижению их окисления, что приводит к стабилизации размеров и z-потенциала комплексов в процессе окисления. В работе [16] с помощью флуоресцентной микроскопии гигантских одноламеллярных везикул, дающих возможность непосредственной визуализации действия гидропероксидов на структуру липидов мембран, исследовали роль различных форм окисленных фосфолипидов на образование микродоменных рафтов при тщательном контроле состава мембран. При окислении липосом в гидрофобных хвостах жирных кислот ФХ появляются гидрофильные перекисные группы, которые переориентируются в пространстве, что приводит к конформационным преобразованиям в фосфолипидах и увеличению их молекулярного объема и, как следствие, к изменению размера и заряда липосом. В этой работе приведены схематические наглядные иллюстрации изменения формы и занимаемого объема для POPC и двух его окисленных видов: POPCOOH и PazePC. В работе приводится также рисунок предполагаемой модели изменения структуры бислоя мембраны в процессе окисления, которая может прояснить сложные процессы, протекающие в биомембранах *in vivo*.

Таким образом, в настоящей работе показано, что инициированное ААРН окисление липосом из соевого ФХ при физиологической температуре ($T = 37^\circ\text{C}$) можно эффективно (на 80-90%) ингибировать фенольными соединениями ЭМГ. При повышении температуры до 60°C значительно увеличивается скорость окисления, и ингибирование образования продуктов окисления липосом существенно уменьшается. Добавление в ФХ липосомы ω -3 АЛК приводит к заметному ускорению окисления, и этот эффект усиливается с ростом температуры. Использование инкапсулирования липосом КН снижает окисление липосом на 70%, а совместное действие его с ЭМГ – на 90%. Изучение динамики изменения размеров и z-потенциала липосом в процессе окисления при физиологической температуре показало, что размер ФХ-липосом увеличивается на 6-7% и не коррелирует с изменением уровня ДК, а абсолютная величина отрицательного z-потенциала увеличивается к концу окисления примерно в 3 раза. Введение в липосомы АЛК увеличивает средний диаметр липосом на 30% к концу окисления, а значения отрицательного z-потенциала уменьшаются. Наличие в липосомах ЭМГ меняет эти закономерности и стабилизирует размеры и z-потенциал и для ФХ-липосом, и для липосом с АЛК. Комплекс ФХ-липосом с КН существенно снижает накопление ДК в процессе окисления и приводит к стабилизации его размеров и z-потенциала. Можно сделать вывод, что изменения z-потенциала и размеров при окислении липосом зависят, главным образом, от перестройки в конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов и от

перегруппировки их полярных головок. Ингибирующие окисление агенты стабилизируют изменения этих параметров в процессе окисления

Список литературы / References:

1. Донелли Д., Ренсли Д., Рид Н. *Пища и пищевые добавки. Роль БАД в профилактике заболеваний*. Т. New York: Acad. Press, 1986, 509 p. [Donelli D., Rensly D., Rid N. Food and nutritional supplements. A dietary supplement role in prevention of diseases (in Russ.). T. New York: Acad. Press, 1986, 509 p.].
2. McClements D.J. *Nanoparticle – and Microparticle-based Delivery Systems: Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds*. New York: CRC Press Taylor and Francis Group, 2014, 30 p.
3. Mosca M., Cerlie A., Ambrosone L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, 2011, vol. 164, pp. 158-165. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2010.12.006.
4. Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Воробьева А.К., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. Ингибирование окисления метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот эфирными маслами. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2016, т. 52, с. 1-76. DOI: 10.7868/S0555109916030120. [Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorob'eva A.K., Terenina M.B., Krikunova N.I. Inibirovanie okisleniya metilovyh efirov nenasyshchennyh zhirnyh kislrot efirnymi maslami. *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya*, 2016, vol. 52, pp. 1-76. (In Russ.)]
5. Semenova M.G., A.S. Antipova A.S., Misharina T.A., Alinkina E.S., Zelikina D.V., Martirosova E.I., Palmina N.P., Binyukov V.I., Maltseva E.L., Kasparov V.V., Ozerova N.S., Shumilina E.A., Baeva K.A., Bogdanova N.G. *Gums and Stabilisers for the Food Industry 18: Hydrocolloid Functionality for Affordable and Sustainable Global Food Solutions*. Cambridge. Publ.: Royal Soc. of Chem., 2016, 182 p.
6. Строев Е.А. *Биологическая химия*. М.: Высш. школа, 1986, 479 с. [Stroev E.A. *Biological Chemistry*. M. Vjsshaja shkola, 1986, 479 p. (in Russ.)]
7. Denisov E.T., Afanas'ev I.B. *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. Boca Raton: CRC Press., 2005, 350 p.
8. Sazhina N.N., Antipova A.S., Semenova M.G., Palmina N.P. Initiated Oxidation of Phosphatidylcholine Liposomes with Some Functional Nutraceuticals. *Russian Journal of Bioorganic. Chemistry*, 2019, vol. 45, no. 1, p. 34. DOI: 10.1134/S1068162019010138
9. Jirovetz L., Buchbauer L., Stoilova L., Stoyanova A., Krastanov A., Schmidt A. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2006, vol. 54, p. 6303. DOI: 10.1021/jf060608c
10. Semenova M.G. Advances in molecular design of biopolymer-based deliverymicro/nanovehicles for essential fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 2017, vol. 68, p. 114.
11. Semenova M.G., Antipova A.S., Belyakova L.E., Polikarpov Yu.N., Anokhina M.S., Grigorovich N.V., Moiseenko D.V. Structural and thermodynamic properties underlying the novel functionality of sodium caseinate as delivery nanovehicle for biologically active lipids. *Food Hydrocolloids*, 2014, vol. 42, p. 149. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.03.028.
12. Perluigi M., Coccia R., Butterfield D.A. 4-Hydroxy-2-Nonenal, a Reactive Product of LipidPeroxidation, and Neurodegenerative Diseases:A Toxic Combination Illuminated by Redox Proteomics Studies. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, vol. 17, no. 11. DOI: 10.1089/ars.2011.4406
13. Soto-Arriaza M.A., Sotomayor C.P., Lissi E.A. Relationship between lipid peroxidation and rigidity in L-alpha-phosphatidylcholine-DPPC vesicles. *Journal Coloid andl Interface Science*, 2008, vol. 323, p. 79. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.04.034.
14. Pinchuk I., Lichtenberg D. Analysis of the kinetics of lipid peroxidation in terms of characteristic time-points. *Chem. Phys. Lipids*, 2014, vol. 178, p. 63. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.12.001
15. Gal S., Pinchuk I., Lichtenberg D. Peroxidation of liposomal palmitoyllinoleoylphosphatidylcholine (PLPC), effects of surface charge on the oxidizability and on the potency of antioxidants. *Chem. Phys. Lipids*, 2003, vol. 126, p. 95. DOI: 10.1016/S0009-3084(03)00096-3
16. Tsubone T.M., Junqueira H.C., Baptista M.S., Itri R. Contrasting roles of oxidized lipids in modulating membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Acta – Biomembranes*, 2019, vol. 1861, p. 660. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.12.017
17. De Rosa R., Spinozzi F., Itri R. Hydroperoxide and carboxyl groups preferential location in oxidized biomembranes experimentally determined by small angle X-ray scattering: Implications in membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 2018, vol. 1860, p. 2299. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.05.011.
18. Istarova T.A., Semenova M.G., Sorokoumova G.M., Selishcheva A.A., Belyakova L.E., Polikarpov Yu.N., Anikhina M.S. Effect of pH on the interactions of sodium caseinate with soy phospholipids in relation to the foaming ability of their mixtures. *Food Hydrocolloids*, 2005, vol. 19, pp. 429. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2004.10.009.

THE INITIATED OXIDATION OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOMS AND CHANGE OF THEIR PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS IN THE COURSE OF OXIDATION**Sazhina N.N., Palmina N.P., Plashchina I.G., Antipova A.S., Semenova M.G.**

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: Natnik48s@yandex.ru

Abstract. In the present work the kinetics of initiated by a water-soluble azo-initiator AAPH oxidation of liposomes from soy phosphatidylcholine (PC) at different temperatures and with addition in them of the alpha-linolenic acid (ALA) and also inhibition of liposome oxidation by essential oil of clove buds (EOC) and liposome encapsulation in sodium caseinate (SC) is studied. Dynamics of change of liposome sizes and z-potential in the course of their oxidation is registered by the method of dynamic light scattering. Results of work showed that the liposome oxidation initiated by AAPH from soy PC at $T = 37^{\circ}\text{C}$ is inhibited effectively (80-90%) by EOC phenolic connections. At temperature increase to 60°C the speed of liposome oxidation increases by 4-5 times, and the inhibition of formation of oxidation products significantly decreases. Addition in PC liposomes of ALA leads to acceleration of oxidation in comparison with PC liposomes. Encapsulation of liposomes by SC reduces liposome oxidation by 70%, and its joint action with EOC – by 90%. With temperature increase decreases the efficiency of protective function of SC cover. In the course of oxidation at $T = 37^{\circ}\text{C}$ the size of PC-liposomes increases by 6-7%, and the absolute value of negative z-potential increases in oxidation end approximately by 3 times. Introduction to liposomes of ALA considerably affects dynamics of change of their sizes and z-potential. Presence of EOC in liposomes stabilizes their sizes and z-potential in the course of oxidation both for PC liposomes, and for liposomes with ALA. The complex of PC-liposomes with SC also leads to stabilization of its sizes and z-potential.

Key words: *liposomes, lipid peroxidation, phosphatidylcholine, essential oil of clove, sodium casein, alpha-linolenic acid.*

К ВОПРОСУ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ МАГНИТНЫХ УСЛОВИЙ (НУЛЕВЫЕ И КОМБИНИРОВАННЫЕ МАГНИТНЫЕ ПОЛЯ) НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ

Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

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

Поступила в редакцию: 20.07.2019

Аннотация. Показано, что снижение интенсивности процессов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина в нейтрофилах в гипоманнитных условиях не зависит от кальций-опосредованных регуляторных механизмов, о чем свидетельствует отсутствие действия внутриклеточного хелатора ионов кальция (ацетоксиметилового эфира 1,2-бис (2-аминофенокси) этан- N,N,N', N'-тетрауксусной кислоты) на интенсивность этого процесса. Это снижение вряд ли обусловлено влиянием гипоманнитных условий на фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы, так как добавка ингибитора протеинкиназы C (Ro 31-6233) практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного дихлордигидрофлуоресцеина. Добавка ингибитора фосфолипазы C (U73122) немного и приблизительно одинаково снизила продукцию АФК как в контроле, так и в опыте. Апоцинин в разных концентрациях вызывал рост продукции АФК в неактивированных нейтрофилах, приблизительно в два раза менее выраженный в гипоманнитных условиях. Об участии электрон-транспортной цепи митохондрий в механизме эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК при добавке ротенона, значительно более выраженное в опытных образцах. Все это резко отличает эффект «нулевого» поля от эффектов комбинированных магнитных полей, в основе которых обнаруживается влияние на регуляторные кальций-зависимые механизмы, контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах.

Ключевые слова: гипоманнитные условия, комбинированные магнитные поля, флуоресценция, хемилюминесценция, активные формы кислорода, нейтрофилы.

Ряд авторов рассматривает возможность влияния магнитных полей на продукцию активных форм кислорода (АФК) как перспективный подход к анализу механизмов их биологического действия [1, 2]. Ранее в экспериментах на цельной крови и нейтрофилах методами активированной хемилюминесценции и флуоресцентной спектроскопии нами было показано усиление генерации свободных радикалов и других АФК в результате действия комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл) [3-7]. В этих работах был в частности зарегистрирован праймирующий эффект (преактивация респираторного взрыва в нейтрофилах) слабых комбинированных постоянного (42 мкТл) и коллинеарного ему низкочастотного переменного (1; 4,4 и 16,5 Гц; 0,86 мкТл) магнитных полей, который проявлялся как более выраженное усиление хемилюминесценции суспензии нейтрофилов, после их предварительной обработки КМП, в ответ на введение бактериального пептида N-формил-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата в присутствии люминола [5]. Было показано лишь небольшое усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) в нейтрофилах после часового действия КМП [7]. Не выявлено взаимосвязи этого увеличения интенсивности ПОЛ с процессом функциональной преактивации нейтрофилов в результате действия КМП, так как ингибитор ПОЛ – ионол (10 мкМ) не снижал в этом случае индекс прайминга. Также не снижала индекс прайминга предварительная добавка перехватчика синглетного кислорода – гистидина (0,1 и 1 мМ) [7] или перехватчика гидроксильных радикалов – диметилсульфоксида в концентрациях до 1 мМ [8]. Значительное ингибирующее действие на интенсивность хемилюминесценции суспензии нейтрофилов оказывал ингибитор миелопероксидазы – азид натрия (0,1 мМ), при этом прайминг в его присутствии не развивался [7]. Также эффективно снижали хемилюминесценцию ингибитор НАДФН-оксидазы – апоцинин и скевенжер гипохлорита – эдаравон [4]. Было показано, что низкие концентрации хелатора внутриклеточного кальция ВАРТА АМ блокируют этот эффект слабых КМП [8]. При этом уровень внеклеточного кальция практически не влияет на степень выраженности праймирования респираторного взрыва. Из этого следует, что одним из ключевых моментов механизма действия слабых КМП на нейтрофилы может являться усиленный выход ионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо. Вторым из экспериментально установленных ключевых моментов механизма преактивации нейтрофилов в слабом КМП является выраженная зависимость величины этого эффекта от концентрации атмосферных газов [9]. Показано, что предварительная мягкая частичная дегазация суспензии нейтрофилов при давлении атмосферных газов 640 мм.рт.ст. приводит к существенному (4х кратному) снижению степени влияния КМП, но практически не отражается на способности клеток генерировать респираторный взрыв в ответ на активатор (пептид N-формил-Met-Leu-Phe) в контроле [9].

Напротив, исключение магнитного поля («нулевое» поле) приводит в ряде случаев к снижению продукции АФК в гипоманнитных условиях в различных типах клеток и при различной экспозиции [10-13]. Нами было

показано, что 1,5 часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомангнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле менее 20 нТл) вызывает снижение базовой внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [14]. При дополнительном введении малых концентраций активаторов респираторного взрыва: формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата этот эффект гипомангнитного поля сохранялся [14]. Учитывая то, что эффект действия гипомангнитного поля проявлялся в опытах на нейтрофилах без дополнительной их стимуляции, и, следовательно, был обусловлен не нарушением ответа нейтрофилов на активаторы респираторного взрыва, нами, с целью определения возможных молекулярных механизмов этого действия «нулевого» поля, проведен комплекс специальных исследований на неактивированных нейтрофилах [15]. В этой связи особый интерес представляет дальнейшее исследование и сравнение молекулярных механизмов действия различных магнитных условий (прежде всего, КМП и «нулевого» МП) на продукцию АФК в нейтрофилах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Установка для воздействия слабыми КМП состояла из двух пар коаксиально расположенных колец Гельмгольца диаметром 140 см (расстояние между кольцами одной пары 70 см), ориентированных вдоль вектора геомагнитного поля. На одну пару колец подавали постоянный ток для формирования заданной величины постоянной составляющей МП $42 \pm 0,1$ мкТл. На вторую пару колец подавали электрический ток от программируемого генератора синусоидальных сигналов (ЦАП платы L-791 фирмы L-Card, Россия) для формирования переменной компоненты поля. Базовая амплитуда переменной компоненты составляла 860 ± 10 нТл. В опытах был использован трехчастотный сигнал 1; 4,4 и 16,5 Гц, показавший активность в предыдущих экспериментах [16], с амплитудами отдельных частот 600; 100 и 160 нТл соответственно. Величины действующих МП определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag – 03 MS 100 (Bartington, UK). Нейтрофилы инкубировали при $37,0 \pm 0,2$ °C в концентрации 1 млн кл/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф. Типичное время инкубации составляло 1 час. При экспонировании суспензии нейтрофилов в гипомангнитном поле для формирования гипомангнитных условий использовалась установка, которая состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических экранов МП из пермаллоя (толщиной 1 мм). Величины остаточных постоянных МП не превышали 20 нТл. Контрольные (геомагнитное поле) и опытные образцы по 10 штук инкубировали при $37,0 \pm 0,2$ °C одновременно. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15-50 нТл. Опыты повторяли не менее трех раз. До начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: хелатор внутриклеточного кальция - ВАРТА АМ (ацетоксиметилловый эфир 1,2-бис (2-аминофенокси) этан- N,N,N', N'-тетрауксусной кислоты) (Sigma, США) в концентрациях 2 или 4 мкМ; ингибитор электрон-транспортной цепи митохондрий - ротенон (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ; ингибитор НАДФН-оксидазы – апоцинин в концентрациях 20 и 500 мкМ; ингибитор фосфолипазы C – U73122 (Sigma, США) в концентрации 2 мкМ и ингибитор протеинкиназы C – бисиндолилмалеимид IV (Ro 31-6233) (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. После 1,5 часовой инкубации к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентный зонд на внутриклеточные АФК H₂DCF-DA до конечной концентрации 0,01 мг/мл. Пробы продолжали инкубировать при 37°C 30 минут в темноте, чтобы минимизировать фотоокисдацию красителей. Затем клетки отмывали, центрифугируя при 600 g 10 мин при комнатной температуре в растворе Хенкса. Далее к осадку добавляли 1 мл среды, ресуспендировали, и регистрировали спектры флуоресценции образцов на приборе Thermo Scientific Lumina Fluorescence Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA), при возбуждении на 488 нм.

После часовой инкубации в КМП суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люминола (Enzo Life Sciences, США) в концентрации 0,35 mM и активатора генерации АФК – хемотаксического формилированного пептида N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ. В этих опытах до начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: дигидрат двуназиевой соли этилендиамин-

тетрауксусной кислоты ($\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$) (Sigma, США) в концентрациях 0,05 и 0,5 % – неселективный хелатора металлов; ротенон (Sigma, США) в концентрации 1 мкМ; блокатор протонных каналов (канал VSOP/HV1) ZnSO_4 100 мкМ [12, 13]. В работе был использован хемилюминиметр Lum-5773 (ООО ДИСофт, Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применялась программа PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%. Для наглядности использован индекс прайминга (ИП) равный отношению максимальной интенсивности хемилюминесценции в опыте к соответствующему значению в контроле. Результаты статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента. Часть результатов по флуоресцентной детекции представлена в процентах, как отношение максимальной интенсивности флуоресценции в опытах к базовому контролю без активаторов, принятому за 100 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомагнитных условиях (при ослаблении геомагнитного поля $\sim$ в 2000 раз) вызывает значительное (на 25%) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF (рис. 1, 2). Добавка в среду для инкубации нейтрофилов хелатора внутриклеточного

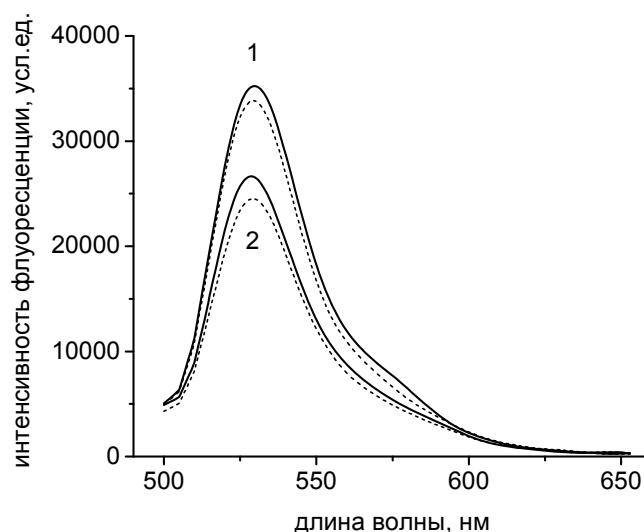


Рисунок 1. Спектры флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в контроле (1) и в опыте (2) – после действия гипомангнитного поля. Пунктирными линиями обозначены стандартные отклонения

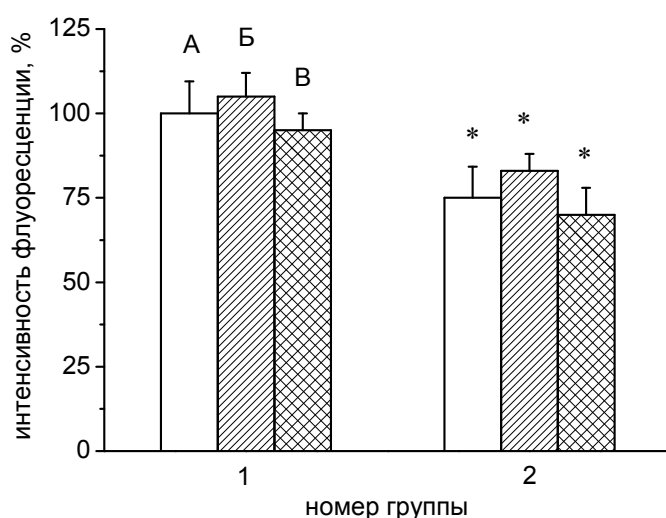


Рисунок 2. Влияние гипомангнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии хелатора внутриклеточного кальция – ВАРТА АМ. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 2 мкМ ВАРТА АМ, в – добавка 4 мкМ ВАРТА АМ. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$)

кальция ВАРТА АМ в концентрациях 2 мкМ и 4 мкМ практически не отразилась на продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах, как в контроле, так и в опыте (гипомагнитные условия) (рис. 2). Это, по-видимому, свидетельствует о независимости эффекта «нулевого» МП от уровня внутриклеточного кальция и в целом от кальций-опосредованных механизмов. Что резко отличает этот эффект от эффекта КМП на этом же объекте (нейтрофилах), при котором, напротив, уже низкие концентрации ВАРТА АМ полностью его блокируют [8].

Добавка ротенона – ингибитора электрон-транспортной цепи митохондрий в концентрации 1 мкМ снизила продукцию внутриклеточных АФК на 20 % в контроле и значительно сильнее в опыте (на 35%) (рис. 3). Это свидетельствует об участии митохондрий в исследуемом эффекте гипомагнитного поля и подтверждает их роль как одного из основных продуцентов АФК в неактивированных нейтрофилах [17]. В этой связи следует отметить, что эффект КМП был независим от введения этого ингибитора в среду культивирования нейтрофилов [18]. Добавка ингибитора фосфолипазы С U73122 снизила приблизительно одинаково (~20%) продукцию АФК как в контроле, так и в опыте (рис. 4). А добавка ингибитора протеинкиназы С Ro 31-6233 практически не отразилась на интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF. Эти не подтверждают участия процессов фосфорилирования компонентов НАДФН-оксидазы в механизмах этого эффекта.

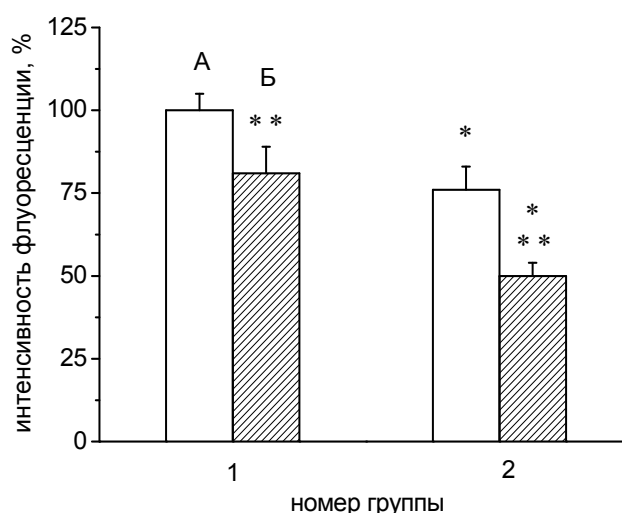


Рисунок 3. Влияние гипомагнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии ротенона. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 1 мкМ ротенона. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$). Двумя звездочками отмечены достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$)

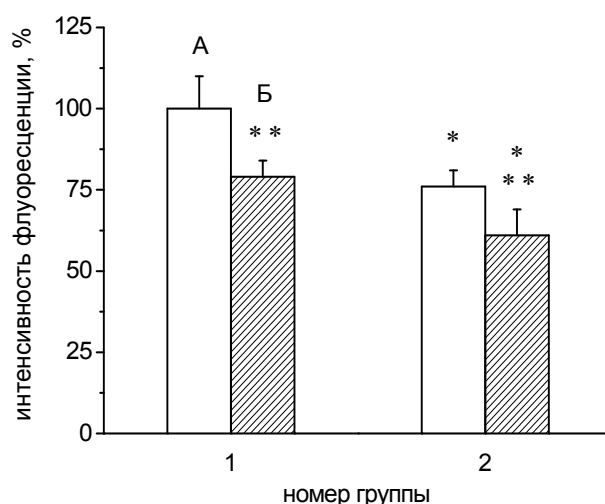


Рисунок 4. Влияние гипомагнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии ингибитора фосфолипазы С – U73122. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 2 мкМ U73122. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$). Двумя звездочками отмечены достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$)

Добавка специфического ингибитора НАДФН-оксидазы апоцинина в разных концентрациях привела к «парадоксальному» росту продукции АФК в неактивированных нейтрофилах, пропорциональному концентрации этого ингибитора, и приблизительно в два раза более выраженному в контрольных случаях (рис. 5). Этот результат можно объяснить исходя из известного факта, что для проявления ингибирующей НАДФН-оксидазы активности апоцинина необходима его димеризация, которая происходит в присутствии пероксидаз и перекиси водорода [19, 20], например, в активированных нейтрофилах. В неактивированных клетках апоцинин может стимулировать продукцию АФК за счет его предшествующего окисления, приводящего к образованию переходных свободных радикалов [21]. В нашем случае важно отметить, что интенсивность этого процесса в опыте (после пребывания в гипомагнитных условиях) значительно снижается.

В целом приведенные данные свидетельствуют о снижении интенсивности процессов окисления использованного флуоресцентного зонда (H2DCF) в нейтрофилах в гипомагнитных условиях, участии митохондрий и их электрон-транспортной системы в этом эффекте «нулевого» поля, возможном снижении интенсивности процессов окисления и других веществ (например, апоцинина), не зависимости эффекта

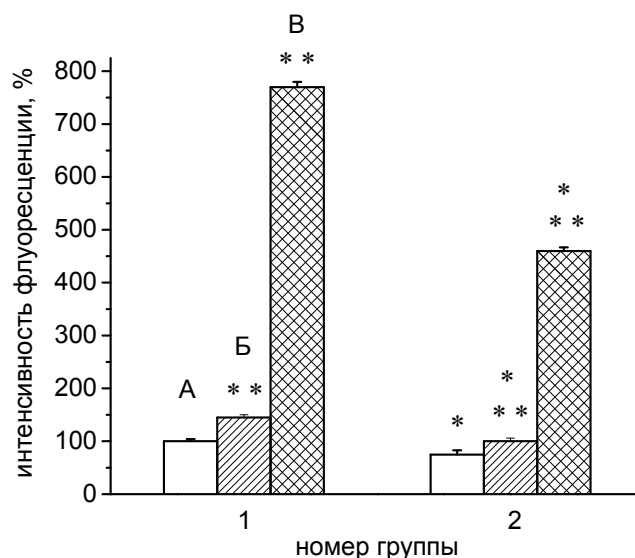


Рисунок 5. Влияние гипомагнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии апоцинина. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$). Ось абсцисс – номер группы. 1 – контроль. 2 – опыт. а – без добавок, б – добавка 20 мкМ апоцинина, в – добавка 500 мкМ апоцинина. Звездочкой отмечены достоверные отличия между группами ($P < 0,05$). Двумя звездочками отмечены достоверные отличия внутри группы ($P < 0,05$)

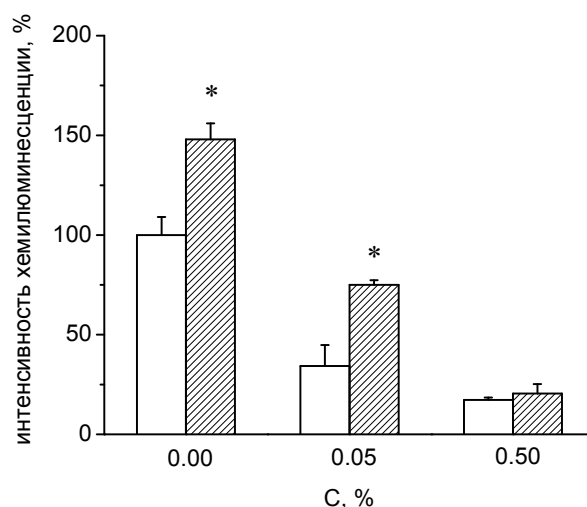


Рисунок 6. Влияние ЭДТА на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при действии КМП. Контроль (без штриховки). Опыт – действие КМП (штриховка). Ось абсцисс – концентрации ЭДТА. Ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

«нулевого поля» от кальций-зависимых регуляторных механизмов, что позволяет предположить его метаболическую основу. Все это резко отличает эффект «нулевого» поля от эффектов комбинированных магнитных полей, с определенными параметрами [3, 16], в основе которых обнаруживается влияние на регуляторные кальций-зависимые механизмы [8], контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах. Так, в случае с КМП добавка в среду для инкубации хелатора металлов ЭДТА привела к значительному снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (рис. 6).

Высокие концентрации ЭДТА (0,5%) снижают интенсивность хемилюминесценции в контроле приблизительно в пять раз, и нивелируют различия между контрольными и опытными образцами (рис. 2). При использовании низких концентраций ЭДТА (0,05%) интенсивность хемилюминесценции образцов также снижается, но в большей степени в контрольных случаях (на 66%). В опыте (предварительное действие КМП) интенсивность хемилюминесценции снизилась лишь на 50%. Это различие обусловило рост индекса прайминга нейтрофилов при действии КМП в присутствии 0,05% ЭДТА с 1,47 до 2,18 (на 48%). Этот результат соответствует ранее сделанным нами наблюдениям о слабой зависимости праймирующего эффекта КМП от концентрации внеклеточного кальция, при добавке различных его количеств в среду для культивирования нейтрофилов, и ведущей роли внутриклеточного кальция в этих процессах [8].

В случае с КМП (в отличие от эффектов нулевого поля) добавка ротенона в среду для инкубации нейтрофилов мало отразилась на интенсивности респираторного взрыва, как в контроле, так и опыте (рис. 7).

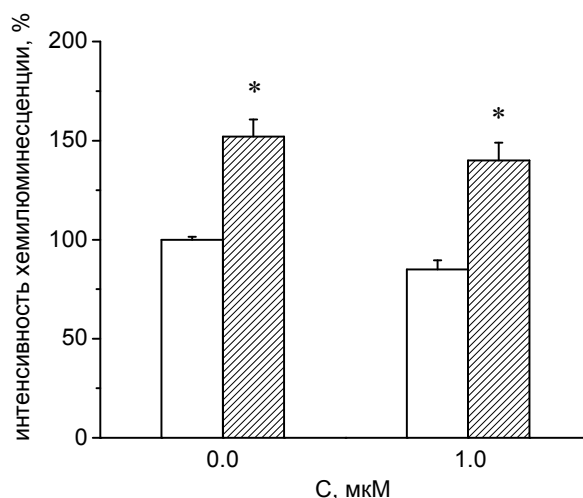


Рисунок 7. Влияние ротенона на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при действии КМП. Контроль (без штриховки). Опыт – действие КМП (штриховка). Ось абсцисс – концентрации ротенона. Ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

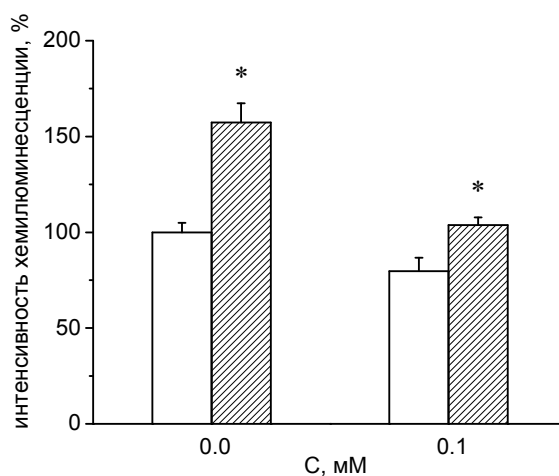


Рисунок 8. Влияние сульфата цинка на интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов при действии КМП. Контроль (без штриховки). Опыт – действие КМП (штриховка). Ось абсцисс – концентрации ZnSO4. Ось ординат – интенсивность хемилюминесценции (максимальные значения) в процентах по отношению к базовому контролю (средние значения и стандартные отклонения). Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

Различия между группами, обусловленные действием КМП, в этом случае полностью сохраняются. Этот факт не позволяет сделать вывод о каком-либо участии электрон-транспортной цепи митохондрий в данном эффекте использованного режима КМП. Добавка сульфата цинка – блокатора протонных каналов VSOP/HV1 снизила интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов в контроле на 22%, а в опыте на 34% (рис. 8).

Большая степень ослабления респираторного взрыва в опыте после действия КМП в условиях ингибирования протонных каналов, по-видимому, обусловлена их ролью в поддержании производства супероксида и поступления кальция в клетки, за счет предотвращения деполяризации мембраны и клеточного подкисления, вызванных электрогенностью НАДФН-оксидазы, осуществляющей перенос электронов через мембрану [12, 13]. Очевидно, что при возросшей нагрузке в результате процесса преактивации (опытная группа) блокировка этих каналов может проявиться в большей степени, чем в менее активном состоянии (контрольная группа), что и наблюдается в эксперименте. По-видимому, в этой связи индекс прайминга нейтрофилов при действии КМП в присутствии 100 мкМ сульфата цинка снизился на 16 %.

Список литературы / References:

1. Mattsson M.O., Simkó M. Grouping of experimental conditions as an approach to evaluate effects of extremely low-frequency magnetic fields on oxidative response in *in vitro* studies. *Frontiers in Public Health*, 2014, vol. 2 (132), pp. 1-11.
2. Barnes F.S., Greenebaum B. The effects of weak magnetic field on radical pairs. *Bioelectromagnetics*, 2015, vol. 36, pp. 45-54.
3. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Действие комбинированных магнитных полей с очень слабой переменной низкочастотной компонентой на люминолзависимую хемилюминесценцию крови млекопитающих. *Биофизика*, 2015, т. 60, № 3, с. 530-533. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The action of combined magnetic fields with a very weak low-frequency alternating component on luminol-dependent chemiluminescence in mammalian blood. *Biophysics (Moscow)*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 429-432]
4. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Действие слабых магнитных полей на хемилюминесценцию крови человека. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 1, с. 126-130. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of weak magnetic fields on the chemiluminescence of human blood. *Biophysics (Moscow)*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 105-108.]
5. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Праймирование респираторного взрыва у нейтрофилов *in vitro* при действии слабых комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 3, с. 510-515. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Priming of the respiratory burst in neutrophils exposed to a combination of weak constant and alternating low-frequency magnetic fields *in vitro*. *Biophysics (Moscow)*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 429-434.]
6. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние слабых магнитных полей на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 6, с. 1159-1163. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of weak magnetic fields on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics (Moscow)*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 959-962.]
7. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Новиков Г.В., Фесенко Е.Е. Роль липидной пероксидации и миелопероксидазы в праймировании респираторного взрыва в нейтрофилах при действии комбинированных постоянного и переменного магнитных полей. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 5, с. 926-931. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Novikov G.V., Fesenko E.E. The role of lipid peroxidation and myeloperoxidase in priming a respiratory burst in neutrophils under the action of combined constant and alternating magnetic fields. *Biophysics (Moscow)*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 759-763.]
8. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Роль гидроксильных радикалов и ионов кальция в праймировании респираторного взрыва в нейтрофилах и усилении люминол-зависимой хемилюминесценции крови при действии комбинированных магнитных полей с очень слабой переменной низкочастотной компонентой. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 3, с. 547-551. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The role of hydroxyl radicals and calcium ions in the priming of a respiratory burst in neutrophils and the increase in luminol-dependent blood chemiluminescence on exposure to combined magnetic fields with a very weak low-frequency alternating component. *Biophysics (Moscow)*, 2017, vol. 62, no. 3, pp. 440-443.]
9. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Роль кислорода в прайминге нейтрофилов при действии слабого магнитного поля. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 2, с. 277-281. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The role of oxygen in the priming of neutrophils on exposure to a weak magnetic field. *Biophysics (Moscow)*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 56-59.]
10. Zhang H., Zhang Z., Mo W. et al. Shielding of the geomagnetic field reduces hydrogen peroxide production in human neuroblastoma cell and inhibits the activity of CuZn superoxide dismutase. *Protein Cell*, 2017, vol. 8, no. 7, pp. 527-537.
11. Martino C.F., Castello P.R. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 8, e22753.
12. Poltanski P., Rajkowska E., Brodecki M. et al. Combined effect of X-ray radiation and static magnetic fields on reactive oxygen species in rat lymphocytes *in vitro*. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, pp. 333-336.
13. Binhi V.N., Prato F.S. Biological effects of the hypomagnetic field: Analytical review of experiments and theories. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 6, e0179340.

14. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 3, с. 484-488. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of a “zero” magnetic field on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics (Moscow)*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 365-368.]
15. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Валеева Э.Р., Фесенко Е.Е. К вопросу о молекулярных механизмах действия «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 4, с. 720-725. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Galeeva E.R., Fesenko E.E. On molecular mechanisms of the effect of a “zero” magnetic field on the production of reactive oxygen species in inactivated neutrophils. *Biofizika*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 720-725. (In Russ.)]
16. Новиков В.В., Пономарев В.О., Новиков Г.В., Кувичкин В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Эффекты и молекулярные механизмы биологического действия слабых и сверхслабых магнитных полей. *Биофизика*, 2010, т. 55, № 4, с. 631-639. [Novikov V.V., Ponomarev V.O., Novikov G.V., Kuvichin V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Effects and molecular mechanisms of the biological action of weak and extremely weak magnetic fields. *Biophysics (Moscow)*, 2010, vol. 55, no. 4, pp. 565-572.]
17. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, 2009, т. 49, с. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Usp. Biol. Himii*, 2009, vol. 49, pp. 341-388. (In Russ.)]
18. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Новикова Н.И., Фесенко Е.Е. Влияние различных химических агентов на прайминг нейтрофилов в слабых комбинированных магнитных полях. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 2, с. 290-295. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Novikova N.I., Fesenko E.E. The effects of various chemical agents on priming of neutrophils exposed to weak combined magnetic fields. *Biophysics (Moscow)*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 209-213.]
19. Stolk J., Hiltermann T.J., Dijkman J.H., Verhoeven A.J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1994, vol. 11, no. 1, pp. 95-102.
20. Vejrazka M., Mícek R., Stípek S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, vol. 1722, no. 2, pp. 143-147.
21. Castor L.R., Locatelli K.A., Ximenes V.F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, vol. 48, no. 12, pp. 1636-1643.

ON MOLECULAR MECHANISMS OF THE EFFECT OF MAGNETIC CONDITIONS (ZERO AND COMBINED MAGNETIC FIELDS) ON THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN NEUTROPHILS

Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E.

Institute of Cell Biophysics RAS

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: docmag@mail.ru

Abstract. It has been shown that the decrease in intensity of 2,7-dichlorodihydrofluorescein oxidation processes in neutrophils under hypomagnetic field exposure is not related to the calcium-mediated mechanisms as evidenced by the absence of the effect of cell-permeant Ca^{2+} chelators such as 1,2-bis-(2-amino-phenoxy)ethane- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -tetraacetic acid acetoxymethyl ester on the intensity of the process alluded. This decrease is hardly caused by effects of exposure to hypomagnetic field on phosphorylation of NADPH-oxidase components because addition of a protein kinase C inhibitor, Ro 31-6233, did not virtually decrease the fluorescence intensity of intracellular dichlorodihydrofluorescein. Addition of a phospholipase C inhibitor, U73122, led to a negligible decrease in ROS production in control (almost same extent as in the experiment). In the presence of apocynin at different concentrations ROS production in unactivated neutrophils increased and it was 2 times lower under hypomagnetic field conditions. A decrease in ROS production which was more apparent during the experiment after addition of rotenone is indicative of the fact that the mitochondrial electron-transport chain is involved in the mechanism of the effect of a “zero” magnetic field. All this sharply distinguishes the effect of the “zero” field from the effects of combined magnetic fields, which are based on the effect on the calcium-dependent regulatory mechanisms that control the respiratory burst in neutrophils.

Key words: hypomagnetic conditions, combined magnetic fields, fluorescence, chemiluminescence, reactive oxygen species, neutrophils.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ СВЕТОВЫХ СТАДИЙ ОКСИГЕННОГО ФОТОСИНТЕЗА

Вершубский А.В., Тихонов А.Н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, д. 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: an_tikhonov@mail.ru
Поступила в редакцию: 23.07.2019

Аннотация. В настоящем сообщении представлены результаты теоретических исследований, посвященных математическому описанию фотосинтетического транспорта электронов, протонного переноса и синтеза АТФ в рамках разработанной нами обобщенной математической модели световых стадий оксигенного фотосинтеза. Модель учитывает ключевые стадии электронного транспорта и протонного переноса в хлоропластах, сопряженного с синтезом АТФ, а также процессы регуляции световых стадий фотосинтеза в хлоропластах высших растений и в клетках цианобактерий. Одной из особенностей нашей модели является то, что в ней рассматриваются функционирование как фотосинтетической, так и дыхательной цепи электронного транспорта. Анализ численных экспериментов позволил выделить факторы, ответственные за появление сложной многофазной кинетики электронного транспорта в зависимости от структурных особенностей фотосинтетического аппарата и условий работы фотосинтетического аппарата (латеральная гетерогенность тилакоидных мембран, наличие альтернативных путей переноса электрона, варьирование газового состава среды и интенсивности света).

Ключевые слова: фотосинтез, электронный и протонный транспорт, математическое моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез играет исключительно важную роль в круговороте веществ и энергии в биосфере. Энергия солнечного света преобразуется в энергию макроэргических соединений, при этом потребляется углекислый газ и выделяется молекулярный кислород. В фотосинтетических системах оксигенного типа (цианобактерии, водоросли, хлоропласты высших растений) имеются две фотосистемы (ФС1 и ФС2), которые, функционируя в «тандеме», обеспечивают перенос двух электронов от воды, окисляемой ФС2, к NADP^+ – терминальному акцептору электронов ФС1 ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ФС2} \rightarrow \text{ФС1} \rightarrow \text{NADP}^+$). Первичные стадии фотосинтеза включают несколько стадий: поглощение света, миграцию энергии поглощенных квантов к фотореакционным центрам ФС1 и ФС2, в которых происходит разделение зарядов и инициируется перенос электронов по цепи электронного транспорта. Образующаяся при этом транс-тилакоидная разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), служит движущей силой работы АТФ-синтазного комплекса, обеспечивающего образование молекул АТФ ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$) [1].

Компьютерное моделирование оксигенного фотосинтеза стало одним из эффективных инструментов для анализа регуляторных процессов фотосинтеза [2-5]. В настоящей работе представлены результаты наших теоретических исследований, посвященных математическому описанию фотосинтетического транспорта электронов, протонного переноса и синтеза АТФ в рамках разработанной нами обобщенной математической модели световых стадий оксигенного фотосинтеза. Модель учитывает ключевые стадии электронного и протонного транспорта в хлоропластах, сопряженного с синтезом АТФ, а также процессы регуляции световых стадий фотосинтеза в хлоропластах высших растений и в клетках цианобактерий. Одной из особенностей нашей модели является то, что в ней рассматриваются функционирование как фотосинтетической, так и дыхательной цепи электронного транспорта [6]. Анализ численных экспериментов позволил выделить факторы, ответственные за появление сложной многофазной кинетики электронного транспорта в зависимости от структурных особенностей фотосинтетического аппарата и условий работы фотосинтетического аппарата (латеральная гетерогенность тилакоидных мембран [7], наличие альтернативных путей переноса электрона [8], варьирование газового состава среды и интенсивности света [9]).

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОКСИГЕННОГО ФОТОСИНТЕЗА

Изучение механизмов регуляции электронного и протонного транспорта и альтернативных путей переноса электронов в клетках фотосинтезирующих бактерий, водорослей и в хлоропластах высших растений – актуальная задача биофизики и биохимии фотосинтеза [10-12]. В настоящем разделе мы кратко остановимся на некоторых наиболее важных аспектах регуляции электронного транспорта в хлоропластах, а затем приведем примеры описания этих процессов в рамках нашей математической модели.

Явление фотосинтетического контроля.

Один из способов регуляции электронного транспорта в хлоропластах связан с тем, что скорость переноса электрона по цепи электронного транспорта (ЦЭТ) зависит от рН внутритилакоидного пространства (pH_{in}) [12].

Это явление получило название фотосинтетического контроля. Один из самых медленных участков переноса электронов в цепи электронного транспорта – окисление пластохинола цитохромным *b₆f*-комплексом, сопряженное с выделением протонов во внутритилакоидный объём. При уменьшении pH_{in} перенос электрона на этом участке ЦЭТ замедляется. Основной поток протонов, уменьшающий трансмембранную разность pH – это поток протонов через АТФ-синтазу. Если в хлоропластах есть избыток субстратов для реакции синтеза АТФ (ADP и P_i) и поддерживается достаточно высокая транс-тилакоидная разность электрохимических потенциалов ионов водорода, то поток протонов через АТФ-синтазу и скорость синтеза АТФ будут высоким. При этом скорость переноса электронов поддерживается на высоком уровне (так называемое метаболическое «состояние 3»). Если ADP заканчивается, то происходит более сильное уменьшение pH_{in} , что вызывает торможение переноса электронов (метаболическое «состояние 4»).

Диссипация избытка энергии в ФС2.

Когда растения подвергаются действию света избыточной интенсивности, то усиливается диссипация энергии возбуждения, являющаяся механизмом защиты ФС2 от фотоингибирования (так называемое явление нефотохимического тушения [11, 12]). Это явление проявляется в усилении нефотохимического тушения флуоресценции (НФТ), не связанного с потреблением энергии света на процессы фотосинтеза. НФТ обычно развивается на свету за 1-2 минуты, а в темноте релаксирует с характерным временем $\tau_{1/2} = 1-2$ мин (энергезависимая компонента НФТ, qE). Светоиндуцируемое развитие qE инициируется уменьшением внутритилакоидного pH_{in} . Повышение концентрации ионов водорода в люмене приводит к протонированию карбоксильных групп регуляторного белка PsbS, что в конечном итоге приводит к конформационным изменениям светособирающей антенны ФС2, в результате которых усиливается НФТ. Кроме этого, уменьшение pH_{in} инициирует превращения пигментов ксантофиллового цикла, которые приводят к усилению НФТ. На избыточном свету виолоксантин превращается в зеаксантин через промежуточное соединение антераксантин. Эта реакция обращается на слабом свету. Эта обратимая последовательность реакций называется циклом ксантофиллов. Зеаксантин увеличивает диссипацию энергии в антенне в тепло, в результате переноса энергии возбуждения с хлорофилла на зеаксантин.

Фосфорилирование белков светособирающего комплекса.

Существует механизм перераспределения энергии поглощаемого света между фотосистемами в зависимости от интенсивности и спектрального состава поглощаемого света. Кроме основных светособирающих комплексов, входящих в состав ФС1 и ФС2, в хлоропластах имеются ещё мобильные светособирающие комплексы (LHCII_m), которые выполняют роль дополнительной антенны. В зависимости от условий освещения эти антенные комплексы могут перемещаться от ФС2 к ФС1 и наоборот [1]. ФС1 и ФС2 расположены в тилакоидной мембране неравномерно. Комплексы ФС2 расположены преимущественно в гранальных тилакоидах и меньше в межгранных, а ФС1 — больше в межгранных тилакоидах и меньше в гранальных. В случае малой освещённости большая часть комплексов LHCII находится вблизи ФС2. При накоплении восстановленных переносчиков в ЦЭТ между фотосистемами, активируется протеинкиназа, которая катализирует фосфорилирование LHCII за счёт молекул АТФ: $LHCII + ATP \rightarrow LHCII-P_i + ADP$. Фосфорилированные антенные комплексы LHCII теряют связь с ФС2 и мигрируют в межгранные тилакоиды, где расположены пигмент-белковые комплексы ФС1, тем самым увеличивая светосбор в ФС1. Существует и обратный процесс – дефосфорилирование LHCII- P_i ; его осуществляет протеинфосфатаза. После дефосфорилирования антенные комплексы LHCII могут обратно переместиться в тилакоиды граны. Благодаря этому фотосинтетический аппарат может приспосабливаться к изменениям интенсивности света, поддерживая оптимальную скорость фотосинтетического транспорта электронов за счёт регуляции числа квантов света, возбуждающих ФС1 и ФС2.

Редокс-регуляция фотосинтетических ферментов.

В фотосинтезирующих системах существует важный механизм регуляции электронного транспорта, обеспечивающий оптимальный баланс NADPH и АТФ в зависимости от условий освещения и метаболического состояния хлоропластов. Молекулы АТФ и NADPH потребляются в темновых реакциях фотосинтеза, в ЦКБ. Ключевой фермент этого цикла — рибулозодифосфаткарбоксилаза (РДФК, сокращённо называемая в англоязычной литературе как RUBISCO). Катализируемая этим ферментом реакция карбоксилирования рибулозо-1,5-дифосфата является самой медленной стадией в этом цикле. Активность РДФК и ряда других ферментов ЦКБ контролируется состоянием их тиоловых групп. Когда тиоловые группы окислены (при этом они образуют -S-S-мостики), то РДФК находится в неактивном состоянии. Если тиоловые группы восстановлены (находятся в состоянии -SH), то РДФК активна. В темноте, когда нет синтеза АТФ, РДФК не активна, при освещении хлоропластов она переходит в активное состояние. Посредником между цепью электронного транспорта и РДФК служит белок тиоредоксин. В состав тиоредоксина тоже входят тиоловые группы. В хлоропластах тиоредоксин (Tr) восстанавливается, принимая два электрона от двух восстановленных молекул Fd^+ ($Tr + 2Fd^+ + 2H^+ \rightarrow TrH_2 + 2Fd$). Данная реакция катализируется ферредоксин-тиоредоксин-редуктазой. Восстановленный тиоредоксин (TrH_2) отдаёт электроны молекуле РДФК, восстанавливая тиоловые группы. Поэтому на свету РДФК активируется и вместе с ростом скорости фотосинтетического переноса электронов возрастает активность ЦКБ. В темновых условиях RUBISCO невыгодно оставаться в активной форме, так как этот фермент катализирует ещё побочную реакцию с молекулярным кислородом – фотодыхание. Поэтому в темноте она инактивируется.

Восстановленный тиоредоксин может также активировать АТФ-синтазу. Взаимодействуя с АТФ-синтазой, TrH_2 восстанавливает -S-S- мостики γ -субъединицы АТФ-синтазного комплекса, в результате чего этот фермент переходит в активное состояние. Зачем это нужно, почему не поддерживать этот АТФ-синтазу всё время в активном состоянии? Для АТФ-синтазы это невыгодно, так как она обладает ещё и АТФазной активностью, и, когда хлоропласт находится в темноте, она будет напрасно гидролизовать АТФ. Поэтому в темноте АТФазы находится в неактивном состоянии. С появлением света АТФ-синтаза активируется за счет восстановленных переносчиков на акцепторном участке ФС1.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Для количественного анализа регуляции ключевых стадий электронного и протонного транспорта в фотосинтетических системах окислительного типа мы использовали базовую математическую модель, описанную ранее [5-10]. Модель описывает основные стадии переноса электронов и сопряженные с ними процессы трансмембранного переноса протонов, а также синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата (P_i) АТФ-синтазой типа $\text{CF}_0\text{-CF}_1$. Схема рассматриваемых процессов показана на рисунке 1.

Электронный транспорт.

Полная схема путей электронного транспорта, описываемых в модели, показана на рисунке 1. Учитываются альтернативные пути электронного транспорта на акцепторном участке ФС1 (см. подробнее [6, 10]). Возможность переноса электронов по альтернативным путям позволяет осуществлять тонкую «настройку» фотосинтетического аппарата, обеспечивая оптимальную стехиометрию молекул NADPH и АТФ, используемых в ЦКБ. Поток электронов от ФС1 к NADP^+ (J_{NADP}) приводит к образованию NADPH за счет электронов, поступающих в ЦЭТ от ФС2 (нециклический транспорт электронов: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ФС2} \rightarrow \text{ФС1} \rightarrow \text{NADP}^+$). Акцептором электрона в ФС1 является ферредоксин (Fd). Два электрона от двух восстановленных молекул ферредоксина (Fd^-) поступают к NADP^+ (через FNR). Циклический поток электронов вокруг ФС1 (J_{SC}), при котором электроны возвращаются в ЦЭТ между ФС2 и ФС1 через ферредоксин-хинон-редуктазу (FQR) [10], будем называть «коротким» циклом. Возможен, в принципе, другой путь циклического переноса электронов вокруг ФС1 (J_{LC}), когда электроны от NADPH возвращаются в ЦЭТ между ФС2 и ФС1 через NAD(P)-оксидо-редуктазу (NDH). Третий путь оттока электронов от ФС1 – перенос электрона от ФС1 на молекулу O_2 (реакция Мелера) [11]. В хлоропластах существуют терминальные оксидазы, катализирующие окисление пластохинола (QH_2) и пластоцианина (Pc) за счет переноса электронов на молекулярный кислород. Вклад этих процессов окисление PQH_2 и Pc невелик, потому при описании процессов фотоиндуцированного транспорта электронов мы пренебрегли этими процессами.

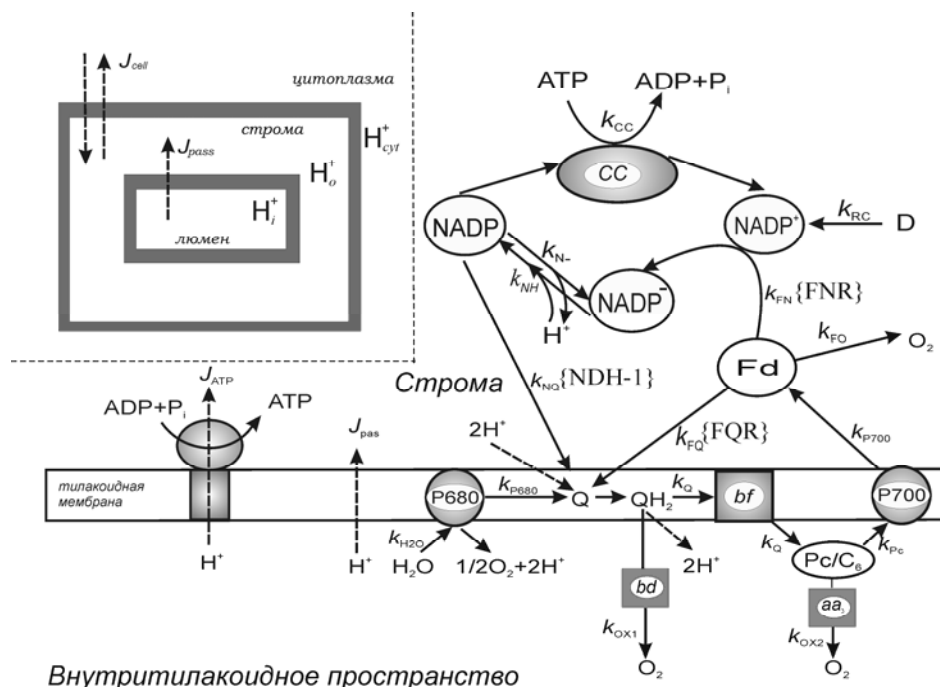


Рисунок 1. Процессы электронного и протонного транспорта, рассматриваемые в модели, и схема компартментализации ионов водорода и трансмембранных потоков протонов, описываемых в модели. Обозначения: Fd – ферредоксин; FNR – ферредоксин-НАДФ-редуктаза; FQR – ферредоксин-хинон редуктаза; NDH-1 – НАД(Ф)Н-оксидо-редуктаза; P_{700} и P_{680} – первичные доноры электрона фотосистемы 1 (ФС1) и фотосистемы 2 (ФС2), соответственно; Pc – пластоцианин; c_6 – цитохром c_6 ; Q – пластохинон (окисленная форма); QH_2 – пластохинол (восстановленная форма); b_6f – цитохромный комплекс b_6f ; aa_3 , bd – терминальные оксидазы типа aa_3 и bd

Восстанавливаемые за счет ФС1 молекулы NADP^+ протонируются ионами водорода, поступающими из стромы ($\text{NADP}^+ + 2\text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADPH}$). В модели предусмотрено, что фотоиндуцированное защелачивание стромы ускоряет потребление NADPH и АТФ в ЦКБ. Потребление NADPH и АТФ описывается феноменологически с помощью функции, зависящей от концентраций NADPH , АТФ и pH стромы (pH_0), как это было предложено в работах [5, 10]. Мы также учитываем, что ФС1 может быть донором электронов для молекулярного кислорода (реакция Мелера).

Протонный транспорт.

Транспорт электронов по ЦЭТ сопряжен с генерацией трансмембранной разности pH (ΔpH). Трансмембранный протонный градиент, формирующийся в тилакоидах вследствие фотосинтетического переноса протонов, выполняет важную энергетическую роль, а также регуляторную и сигнальную функции [12]. Фотоиндуцированные изменения pH в компартментах хлоропласта оказывают заметное влияние на кинетику переноса электронов по фотосинтетической ЦЭТ, нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, обратимую редокс-трансформацию ксантофиллов (так называемый виолаксантиновый цикл), функциональное состояние АТФ-синтазы, активность ферментов темновой фазы фотосинтеза. Накопление протонов внутри тилакоидов происходит в результате индуцированного светом разложения воды в ФС2 и окисления пластохинола (QH_2) цитохромным b_6/f -комплексом. В модели учитывается, что ионы водорода, локализованные внутри (люмен) и снаружи (stroma) тилакоидов, могут связываться с протон-акцепторными (буферными) группами, число которых значительно превышает число электронных переносчиков. Влияние буферных групп заметно сказывается на кинетике достижения стационарного состояния системы, однако стационарные значения переменных модели не должны зависеть от буферной емкости хлоропластов [10].

Выход протонов из тилакоидов в строму может происходить двумя путями: через АТФ-синтазу (сопряженный с синтезом АТФ поток протонов J_{ATP}) и путем пассивной утечки протонов, не связанной с синтезом АТФ (поток протонов J_{pass}). В модели также учитывается обмен протонами между стромой и цитозолем (поток протонов J_{cell}). Для моделирования процессов переноса протонов через тилакоидную мембрану мы использовали функции, описывающие «активный» (сопряженный с синтезом АТФ, J_{ATP}) и «пассивный» (утечка протонов через мембрану, J_{pass}) потоки протонов, которые зависят от разности концентраций ионов водорода $[\text{H}_i^+]$ и $[\text{H}_0^+]$. «Активный» поток протонов J_{ATP} зависит также от соотношения концентраций АДФ и АТФ – субстрата и продукта реакции, катализируемой АТФ-синтазой. Обоснование того, как выбирается функция, описывающая трансмембранный перенос протонов через АТФ-синтазу, а также описание функций и констант, определяющих потоки J_{cell} и J_{pass} , можно найти в предыдущих работах [5, 10].

Переменные модели.

Описывается поведение следующих переменных: $[\text{P}_{700}^+]$ – концентрация окисленных центров P_{700} (первичный донор электронов в ФС1), $[\text{P}_{680}^+]$ – концентрация окисленных центров P_{680} (первичный донор электронов в ФС2), $[\text{Pc}]$ – концентрация окисленных переносчиков, являющихся непосредственными донорами электронов для окисленных центров P_{700}^+ (пластоцианин в хлоропластах и/или цитохром c_6 у цианобактерий), $[\text{Q}]$ – концентрация окисленного пластохинона, $[\text{Fd}]$ – концентрация окисленного ферредоксина, $[\text{N}^+]$ и $[\text{NH}]$ – концентрации терминального акцептора ФС1 в окисленной и восстановленной формах соответственно – NADP^+ и NADPH . Переменная $[\text{ATP}]$ описывает изменения концентрации АТФ. Переменные $[\text{H}_i^+]$ и $[\text{H}_0^+]$ описывают изменения концентраций ионов водорода во внутритилакоидном пространстве и в строме, соответственно. Система уравнений, описывающая поведение электронных переносчиков, изменение концентрации протонов внутри тилакоида и в строме, процессы выделения и потребления молекулярного кислорода и изменение концентрации АТФ была рассмотрена нами ранее в работах [5-10].

Константы скоростей и параметры модели.

Система кинетических уравнений, описывающих динамику изменений концентрации электронных переносчиков, АТФ и ионов водорода, а также методология выбора эффективных констант скоростей электрон-транспортных процессов, обозначенных на рисунке 1, подробно описаны в наших работах [5, 10]. Ключевой стадией в цепи электрон-транспортных процессов, определяющей скорость переноса электронов между ФС2 и ФС1, является окисление пластохинола (QH_2) цитохромным b_6/f -комплексом. Скорость окисления QH_2 , как известно, зависит от концентрации ионов водорода внутри тилакоидов $[\text{H}_i^+]$. В нашей модели скорость окисления QH_2 характеризуется функцией $k_Q([\text{Q}], [\text{Pc}], [\text{H}_i^+])$, которая соответствует эффективной константе скорости k_Q , показанной на рисунке 1. Функция $k_Q([\text{Q}], [\text{Pc}], [\text{H}_i^+]) = 1/\tau_Q$ эквивалентна кажущейся константе скорости, характеризующей совокупность процессов, приводящих к окислению QH_2 . Величина τ_Q – характерное время окисления QH_2 , которое определяется скоростью непосредственного взаимодействия QH_2 с цитохромным b_6/f -комплексом и временем переноса электрона от b_6/f -комплекса на молекулу пластоцианина (Pc). Адекватный выбор функции $k_Q([\text{Q}], [\text{Pc}], [\text{H}_i^+])$ был выполнен нами ранее (см. подробнее работы [5, 10]) на основании сравнения экспериментальной и теоретической зависимостей кинетики восстановления окисленных центров P_{700}^+ после выключения света от внутритилакоидного pH_{in} .

Значения других констант скоростей, характеризующих различные стадии переноса электрона по ЦЭТ от водорасщепляющего комплекса ФС2 к различным акцепторам ФС1 (константы k_{H_2O} , k_{P680} , k_{Pc} , k_{P700} , k_{FN} , k_{NH} , k_{O_2}), выбирали на основании литературных данных по кинетике частных реакций электронного транспорта на различных участках ЦЭТ [10]. Выбранные нами константы скоростей электрон-транспортных процессов, находятся в диапазонах характерных времен, полученных в экспериментальных работах. Для уточнения констант, использованных в нашей модели, мы сравнивали результаты расчетов с экспериментальными данными, полученными для различных фотосинтетических систем окислительного типа (хлоропласты высших растений, цианобактерии) (см. подробнее: [10]). В качестве критерия адекватного выбора констант скоростей мы использовали согласие теоретических кривых с экспериментальными значениями скорости переноса электронов на участке между ФС2 и ФС1, а также значений pH_i и pH_o в метаболических состояниях 3 (условия интенсивного синтеза АТФ) и 4 (состояние фотосинтетического контроля). При этом мы исходили, в частности, из того, что в стационарных состояниях 3 и 4 $pH_{in} \approx 6,0-6,2$ и $pH_{in} \approx 5,4-5,6$, соответственно [12].

Выбор эффективной константы скорости k_{FQ} , характеризующей циклический транспорт электронов вокруг ФС1 («короткий» цикл), неоднозначен, поскольку в литературе отсутствуют надежные экспериментальные данные о значениях элементарных констант скоростей на этом участке ЦЭТ. Мы рассматриваем константу k_{FQ} в качестве варьируемого параметра, конкретное значение которой зависит от выбора моделируемой системы. Предпосылкой к этому является то обстоятельство, что циклические потоки электронов в хлоропластах высших растений и в клетках цианобактерий могут заметно различаться. Считается, что у цианобактерий вклад циклического транспорта электронов выше, чем у растений. Эффективная константа скорости k_{NQ} , характеризующая скорость работы «длинного» пути циклического транспорта электронов, была выбрана на порядок ниже константы скорости k_{FQ} .

pH-зависимая регуляция электронного транспорта.

В интактных хлоропластах фотосинтетический транспорт электронов регулируется на двух участках ЦЭТ: (1) между ФС2 и ФС1 и (2) на стадии оттока электронов от ФС1 в цикл Кальвина-Бенсона (ЦКБ) [11]. Кинетика фотоокисления P_{700} определяется соотношением скоростей оттока и притока электронов к ФС1. Наблюдаемое в эксперименте увеличение концентрации P_{700}^+ может быть обусловлено не только с ускорением оттока электронов от ФС1 в результате активации ЦКБ, но и ослаблением притока электронов к P_{700}^+ вследствие фотоиндуцированного закисления люмена [12]. Уменьшение pH_{in} может замедлять окисление QH_2 цитохромным b_6f -комплексом [12], а также ослаблять активность ФС2 вследствие усиления нефотохимического тушения (НФТ) возбуждения молекул хлорофилла в светособирающей антенне ФС2 [11]. Все три фактора регуляции электронного транспорта — активация ЦКБ, замедление окисления QH_2 и усиление НФТ — зависят от фотоиндуцированных изменений pH в строме и в люмене. Светоиндуцированное защелачивание стромы ($pH_{out} 7 \rightarrow pH_{out} 8$) способствует ускорению реакций ЦКБ, в то время как снижение pH_{in} вызывает замедление притока электронов к P_{700}^+ . Фотоиндуцированные изменения pH_{out} и pH_{in} проявляются в кинетике фотоокисления P_{700} в интактных хлоропластах, адаптированных к темноте [11, 22]. Перераспределение электронных потоков между нециклическим и циклическими путями также может сказываться на кинетике окислительно-восстановительных превращений P_{700} .

Моделирование электрон-транспортных процессов с учетом ЦКБ и НФТ позволило нам описать вклад отмеченных выше факторов в кинетику фотоиндуцированных превращений P_{700} в листьях высших растений. На рисунке 2 приведены результаты численных экспериментов, моделирующих влияние pH-зависимой регуляции ЦКБ и электронного транспорта между ФС2 и ФС1 на кинетику фотоиндуцированных редокс-превращений P_{700} (а), пластохинона (б), а также на изменения внутрилакоидного pH_{in} (в). Расчеты выполнены для начальных условий, соответствующих окисленному пулу пластохинона и избытку ADP. Вначале «включали» дальний красный свет (ДКС), возбуждающий преимущественно ФС1, а затем белый свет (БС), возбуждающий обе фотосистемы. Из рис. 2а видно, что функционирование циклического транспорта вокруг ФС1 несколько замедляет окисление P_{700} и Q при действии ДКС. Заметно более сильное влияние циклического транспорта проявляется при действии БС. В случае, когда работает лишь цепь нециклического транспорта (кривые 1 и 2), происходит заметный спад [P_{700}^+] в ответ на включение БС. В этих условиях, когда циклический транспорт электронов пренебрежимо мал, кинетическая кривая имеет немонотонный вид с «провалом» в первое время после включения БС. Это обусловлено тем, что ЦКБ не активен в начальный период освещения, а потому отток электронов от ФС1 тормозит фотоокисление P_{700} .

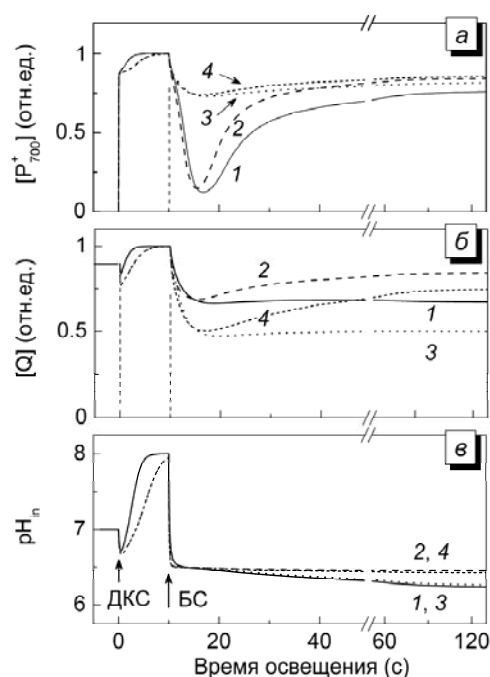


Рисунок 2. Кинетики фотоиндуцированных изменений относительных концентраций окисленных реакционных центров P_{700}^+ (а), окисленного пластохинона PQ (б) и фотоиндуцированных изменений внутритилакоидного pH_{in} (в), рассчитанные с учетом различных условий электронного транспорта в интактных хлоропластах. Кривая 1 – контроль (без учета НФТ при низкой интенсивности циклического транспорта электронов вокруг ФС1), 2 – учет нефотохимического тушения (максимальное ослабление активности ФС2 составляло 3 раза), 3 – учет циклического пути вокруг ФС1 (константа k_{FQ} увеличена в 10 раз по сравнению с кривыми 1 и 2), 4 – учет НФТ и циклического пути вокруг ФС1 (по материалам работы [13])

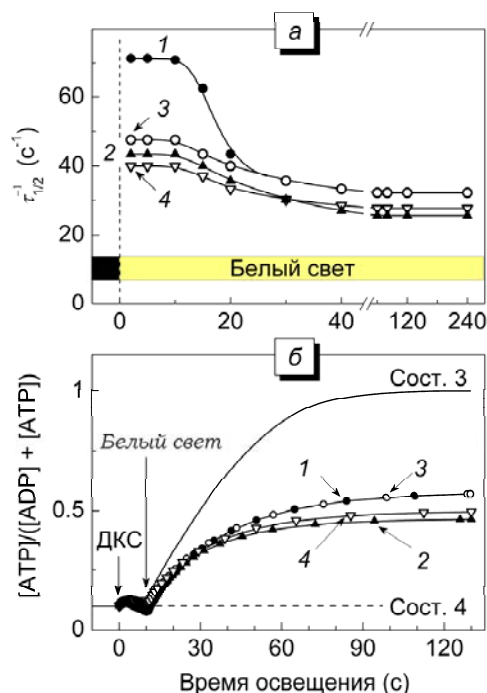


Рисунок 3. Расчетные зависимость скорости переноса электронов между ФС2 и ФС1 (параметр $\tau_{1/2}^{-1}$) от длительности действия белого света (а) и кинетические кривые, отражающие скорость производства-потребления АТР (б) с учетом таких факторов, влияющих на электронный транспорт, как ослабление активности ФС2 вследствие усиления нефотохимического тушения возбуждения молекул хлорофилла в светособирающей антенне ФС2 и перераспределение электронных потоков между нециклическим и циклическими путями. Номера кривых соответствуют таковым на рисунке 6. Для сравнения на панели (б) приведены расчетные кинетические кривые, моделирующие изменения $[ATP]$ в хлоропластах класса Б в метаболических состояниях 3 и 4 (по материалам работы [13])

По мере активации ЦКБ отток электронов от ФС1 усиливается, благодаря чему происходит рост $[P_{700}^+]$. Интересно, что циклический транспорт электронов (кривые 3 и 4) способствует окислению P_{700} в условиях низкой активности ЦКБ. Это происходит вследствие того, что отток электронов от ФС1 облегчается вследствие окисления Fd^+ за счет работы цепи циклического транспорта электронов ($ФС1 \rightarrow Fd \rightarrow Q$). Заметный вклад циклического транспорта четко проявляется в начальный период освещения белым светом, составляющий около 20 секунд (кривые 3 и 4). За счет перераспределения потоков на акцепторной стороне ФС1 провал на кинетической кривой P_{700}^+ практически исчезает.

Форма кривой фотоокисления P_{700} зависит также от того, было ли в расчетах учтено влияние нефотохимического тушения (НФТ). Генерация НФТ приводит к тому, что P_{700}^+ достигает стационарного состояния быстрее, чем без НФТ, при этом устанавливается более высокий стационарный уровень P_{700}^+ (кривая 2). Это связано с тем, что при НФТ приток электронов от ФС2 к ФС1 уменьшается, поскольку активность ФС2 ослабевает вследствие усиления рассеяния энергии в светособирающей антенне ФС2.

Кинетические кривые для концентраций окисленного пластохинона ($[Q]$) показаны на рисунке 2б. Первоначально почти практически все молекулы Q находятся в окисленном состоянии, что характерно для хлоропластов, адаптированных к темноте. После включения БС происходит быстрое восстановление части пластохинонового пула. Учет НФТ и цепи циклического транспорта оказывает заметное влияние на кинетику фотоиндуцированных изменений $[Q]$ (кривые 2 и 4). Если НФТ неактивно (кривые 1 и 3), то пул пластохинона восстановлен заметнее вследствие замедления окисления QH_2 из-за более сильного закисления люмена (рис. 2в). По сравнению с кинетикой фотоокисления P_{700} , влияние НФТ на кинетику окислительно-восстановительных

превращений пластохинона проявляется заметнее и приводит к повышению стационарного уровня Q . Это объясняется тем, что РQ является акцептором электронов, донируемых ФС2, а НФТ ослабляет работу ФС2.

Динамика фотоиндуцированных изменений pH_{in} показана на рисунке 2в. Интересно, что кинетика изменений pH_{in} практически не зависит от работы цепи циклического электронного транспорта вокруг ФС1 (кривые 1 и 3). Это объясняется тем, что циклический транспорт электронов влияет на перераспределение потоков на акцепторной стороне ФС1 во время индукционной фазы, но практически не затрагивает трансмембранные потоки протонов и работу АТР-синтазы. Как и следовало ожидать, в этом случае кинетические кривые, отражающие изменения pH_{in} (рис. 2в) и $[АТР]$ (рис. 3б), практически не изменяются при наличии циклического транспорта электронов вокруг ФС1. С другой стороны, кинетика закисления люмена чувствительна к НФТ. Если не работает механизм активации НФТ (кривые 1 и 3, рис. 2в), то происходит более сильное снижение pH_{in} , чем в случае генерации НФТ (кривые 2 и 4). Включение НФТ несколько ослабляет фотоиндуцированный спад pH_{in} , что отражается на кинетике фотоиндуцированных изменений переменных $[P_{700}^+]$ и $[Q]$. Кинетика фотоиндуцированных изменений переменной $[АТР]$ также оказалась чувствительной к НФТ: стационарный уровень, отражающий баланс производства-потребления АТР оказался при этом на 20% ниже (кривые 2 и 3, рис. 3б).

На рисунке 3 представлены результаты расчетов кинетического параметра $\tau_{1/2}^{-1}$, характеризующего скорость восстановления P_{700}^+ , в зависимости от длительности действия БС на интактные хлоропласты. Зависимость $\tau_{1/2}^{-1}$ от длительности освещения показывает как скорость переноса электронов между ФС2 и ФС1 зависит от таких факторов регуляции электронного транспорта, как НФТ (кривые 2 и 4) и работа циклического транспорта электронов вокруг ФС1 (кривые 3 и 4). Как и в случае хлоропластов класса Б (В хлоропластах класса Б, лишенных оболочки, отсутствуют ферменты ЦКБ; однако, при этом сохраняется целостность (замкнутость) тилакоидов, благодаря чему хлоропласты класса Б способны генерировать ΔpH и синтезировать АТР), замедление потока электронов между ФС2 и ФС1 обусловлено снижением pH_{in} люмена. Если генерации НФТ не происходит, то поток электронов остается высоким в течение первых 10 секунд освещения, затем наступает торможение электронного переноса. По мере дальнейшего действия БС различие между скоростями переноса электронов к P_{700}^+ становится незначительным.

Нециклический, циклический и псевдоциклический потоки электронов.

На акцепторной стороне ФС1 поток электронов может разделяться на три части: 1) линейный поток электронов от ферредоксина к $NADP^+$ (J_{NADP}), 2) циклический транспорт вокруг ФС1 через FQR («короткий» путь, поток J_{sc}) и через NDH-1 («длинный» путь, поток J_{LC}), когда электроны возвращаются в ЦЭТ на уровне пластохинонового пула, и 3) поток электронов на кислород (J_{O_2}).

На рисунке 4 показано как изменяются потоки электронов в ходе индукционного периода. Изменения потоков электронов и соотношения между ними обусловлено несколькими факторами: а) зависимостью фотохимической активности ФС2 от внутритилакоидного и стромального pH, б) активацией ферментов ЦКБ в результате фотоиндуцированного защелачивания стромы и в) влиянием pH внутритилакоидного пространства на скорость работы АТР-синтазы. Из рисунка 4 видно, что в обеих модельных системах (модели хлоропластов и

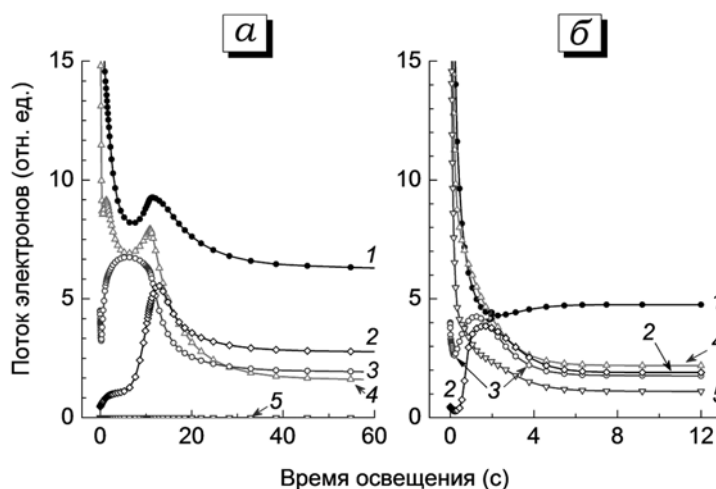


Рисунок 4. Потоки электронов на акцепторной стороне ФС1 для хлоропластов (А) и цианобактерий (Б) при газовом составе атмосферы: $[O_2] = 21\%$, $[CO_2] = 0,04\%$. Кривая 1 – поток электронов через ФС2, 2 – поток электронов от НАДФН в ЦКБ (J_{NADP}), 3 – поток электронов от ферредоксина к O_2 , 4 – поток электронов от ферредоксина к хинону («короткий» цикл), 5 – поток электронов от НАДФН в пластохинону («длинный» цикл) (по материалам работы [14])

цианобактерий) поток электронов от ФС2 к пластохиноновому пулу (J_{PS2}) немонотонно изменяется со временем. После включения света происходит значительный скачок потока J_{PS2} , который затем сменяется его постепенным уменьшением. Ослабление потока электронов через ФС2 вызвано несколькими причинами. Индуцированное светом закисление внутритилакоидного пространства ($pH_i \downarrow$) подавляет фотохимическую активность ФС2 за счет усиления нефотохимического тушения возбуждения в светособирающей антенне ФС2. Кроме этого, уменьшение pH_i вызывает замедление скорости окисления пластохинола (QH_2) цитохромным b_6f -комплексом. Наконец, индуцированное светом защелачивание стромы ($pH_o \uparrow$) должно затруднять протонирование пластохинола, восстанавливаемого за счет ФС2 ($Q + 2e^- + H_o^+ \rightarrow QH_2$), дополнительно ослабляя тем самым поток электронов от ФС2 к ФС1. Все эти регуляторные связи были учтены при построении нашей модели.

Из рисунка 4 видно, что в обоих случаях, как в случае «цианобактерий», так и в «хлоропластах», поток электронов через ФС2 (кривая 1) заметно выше, чем остальные потоки электронов. Особый интерес представляет тот факт, что во время индукционной фазы происходит существенное перераспределение потоков электронов на акцепторной стороне ФС1. В начальный период, составляющий около 20 секунд для «хлоропластов» (рис. 4а) и около 2 секунд для «цианобактерий» (рис. 4б), имеется значительный поток электронов от ФС1 к O_2 (кривая 3). Это согласуется с известными представлениями о том, что поток электронов на O_2 (реакция Мелера) играет роль шунта, который позволяет избежать «перевосстановления» переносчиков на акцепторной стороне ФС1. Эта роль молекулярного кислорода особенно заметна на начальных стадиях освещения, когда поток электронов от ФС1 в ЦКБ (кривая 2) сравнительно мал из-за низкой активности ферментов ЦКБ. В начальной стадии индукционной кривой также виден заметный вклад циклического потока электронов вокруг ФС1 (кривая 4, «короткий цикл»). В случае «цианобактерий» заметную роль играет и «длинный» цикл (циклический перенос электронов по цепи $ФС1 \rightarrow НАДФН \rightarrow NDH-1 \rightarrow Q$, кривая 5). По мере активации реакций ЦКБ, после некоторой лаг-фазы длительностью ~ 5 с, отток электронов от ФС1 в ЦКБ заметно возрастает и, соответственно, ослабевают остальные потоки электронов.

Поток электронов от ФС1 в ЦКБ (кривая 2) возрастает по мере активации ЦКБ. В случае «хлоропластов» происходит более заметное увеличение потока от ФС1 в ЦКБ (J_{NADP}) по сравнению с «цианобактериями». При этом, однако, меньшую роль играет циклический электронный транспорт (рис. 4б). «Короткий» циклический поток электронов вокруг ФС1 (через FQR, кривая 4) и «длинный» циклический поток (через NDH-1, кривая 5) играют заметную роль в перераспределении потоков электронов на акцепторной стороне ФС1 лишь в случае «цианобактерий» (рис. 4а).

Влияние CO_2 и O_2 на фотоиндуцированные редокс-превращения P_{700} .

Фотосинтетический транспорт электронов у фотосинтезирующих организмов кислородного типа зависит от концентраций CO_2 и O_2 в атмосфере листа или в суспензии клеток цианобактерий. Увеличение концентрации CO_2 и O_2 стимулирует поток электронов от ФС1 и уменьшает нефотохимическое тушение. На рисунке 5а показаны кривые, моделирующие кинетику фотоокисления P_{700} в зависимости от концентрации O_2 в суспензии цианобактерий при двух фиксированных концентрациях CO_2 . Варьирование концентрации кислорода заметно сказывается на кинетике фотоокисления P_{700} , как в присутствии CO_2 (рис. 5а), так и в его отсутствие (рис. 5б). В

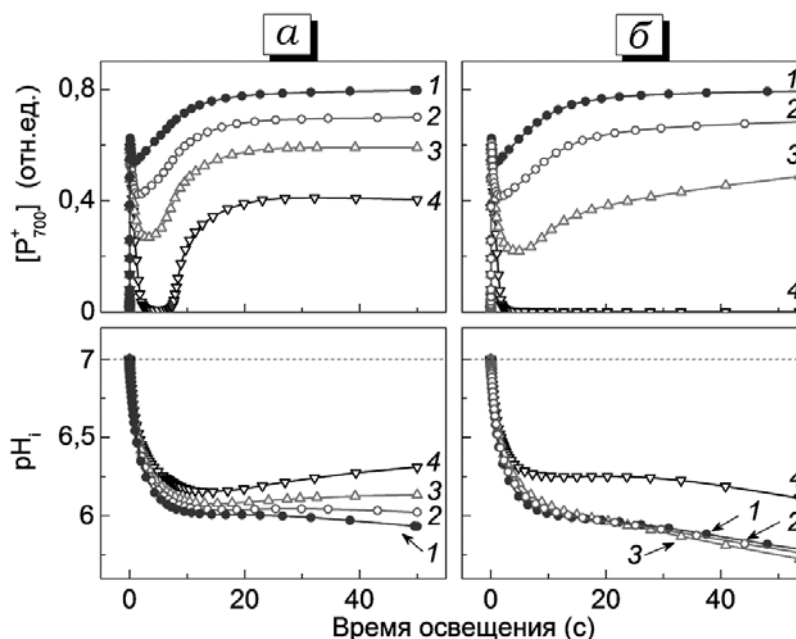


Рисунок 5. Влияние газового состава (CO_2 и O_2) на кинетику фотоиндуцированных изменений переменных $[P_{700}^+]$ и pH_i . А – $[CO_2] = 0.04\%$. Б – $[CO_2] = 0$. Кривые 1-4 соответствуют различным концентрациям O_2 : 1 – 40 % O_2 , 2 – 21 % O_2 , 3 – 10 % O_2 , 4 – 2 % O_2 (по материалам работы [14])

ответ на включение света происходят немонотонные изменения концентрации P_{700}^+ . После быстрого первоначального скачка [P_{700}^+] сначала падает, а затем сравнительно медленно растет до стационарного уровня. С понижением концентрации O_2 сильнее спадает [P_{700}^+], при этом появляется сравнительно длительная лаг-фаза, предшествующая росту [P_{700}^+], и заметно снижается стационарный уровень [P_{700}^+]. Эти результаты согласуются с экспериментальными данными по кинетике фотоиндуцированных превращений P_{700} в клетках цианобактерий и в листьях высших растений [9]. В отсутствие CO_2 влияние O_2 на кинетику фотоокисления P_{700}^+ становится еще более выраженным (рис. 5б).

Кинетика фотоокисления P_{700} определяется соотношением скоростей оттока и притока электронов к ФС1. Скорость переноса электронов на участке ЭТЦ между ФС2 и ФС1, как известно [12], контролируется величиной внутритилакоидного pH_{in} . Можно предположить, что уменьшение концентрации [P_{700}^+] в анаэробных условиях обусловлено не только с ослаблением оттока электронов от ФС1, но и с ускорением притока электронов к ФС1. Последнее может быть связано с более слабым снижением pH_{in} и/или возрастанием циклического потока электронов вокруг ФС1. Из рисунка 5 видно, что в отсутствие CO_2 происходит более сильное закисление внутритилакоидного пространства, чем в «атмосферных» условиях (0,03 % CO_2). В отсутствие CO_2 не происходит потребления АТФ в ЦКБ, а потому АТФ-синтазы работают менее интенсивно и, соответственно, ослабляется утечка протонов из тилакоидов в строму. Снижение pH_{in} при удалении CO_2 , в свою очередь, должно ослаблять приток электронов к ФС1 по двум причинам: из-за торможения реакции окисления пластохинола и усиления НФТ. На основании этого мы можем заключить, что уменьшение концентрации P_{700}^+ при удалении CO_2 обусловлено, в первую очередь, замедлением оттока электронов от ФС1, а не усилением притока электронов к ФС1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компьютерный анализ электронного транспорта и трансмембранного переноса протонов в хлоропластах и клетках цианобактерий, проведенный с помощью математической модели фотосинтеза, учитывающей ключевые стадии pH-зависимой регуляции электронного транспорта на акцепторном и донорном участках ФС1, показал, что наша модель адекватно описывает основные закономерности фотоиндуцированного транспорта электронов в хлоропластах и клетках цианобактерий. Модель позволяет количественно описать сложную немонотонную кинетику фотоиндуцированных редокс-превращений P_{700} , наблюдаемую в опытах с интактными хлоропластами и клетками цианобактерий, адаптированными к темноте. Изменение внутритилакоидного pH является одним из главных факторов, контролирующих поток электронов между ФС2 и ФС1. Фотоиндуцированное уменьшение pH_{in} вызывает замедление переноса электронов на участке ЦЭТ, связанном с b_6f -комплексом, и запускает механизм, способствующий увеличению рассеяния энергии в светособирающей антенне ФС2, препятствуя перевозбуждению реакционных центров ФС2 и чрезмерному закислению люмена. Эти механизмы обеспечивают стабильность работы фотосинтетического аппарата при изменениях условий окружающей среды, например, при варьировании интенсивности освещенности и газового состава атмосферы. Смоделировано влияние газового состава среды (CO_2 и O_2) на кинетику индукционных процессов в хлоропластах и клетках цианобактерий (фотоокисление P_{700} , генерация трансмембранной разности pH) в зависимости от предыстории освещения (аэробные или анаэробные условия). На начальной стадии индукционного периода существенный вклад в работу фотосинтетической цепи электронного транспорта вносят циклический поток электронов вокруг ФС1, который ослабевает по мере освещения и активации реакций цикла Кальвина-Бенсона. По мере торможения нециклического транспорта электронов усиливается альтернативный поток электронов на акцепторной стороне ФС1 (восстановление O_2 – реакция Мелера). В заключение отметим, что дальнейшее развитие модели может идти по пути учета структурных перестроек тилакоидов, которые, в свою очередь, могут влиять на эффективность фотосинтетических процессов и регуляцию энергетического баланса в хлоропластах и клетках цианобактерий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00214).

Список литературы / References:

1. Blankenship R.E. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science Inc, Malden. 2002.
2. Rubin A., Rizinichenko G. *Mathematical Biophysics*. Series: Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering, XV. 2014.
3. Tikhonov A.N. Modeling electron and proton transport in chloroplasts. In: *Chloroplasts. Current research and future trends*. Ed. Kirchoff H. Poole: Caister Acad. Press, 2016, pp. 101-134.
4. Tikhonov A.N., Vershubskii A.V. Computer modeling of electron and proton transport in chloroplasts. *Biosystems*, 2014, vol. 121, pp. 1-21.

5. Vershubskii A.V., Nevyantsev S.V., Tikhonov A.N. Modeling of Electron and Proton Transport in Chloroplast Membranes with Regard to Thioredoxin-Dependent Activation of the Calvin–Benson Cycle and ATP Synthase. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2018, vol. 12, pp. 287-302.
6. Vershubskii A.V., Mishanin V.I., Tikhonov A.N. Modeling of the photosynthetic electron transport regulation in cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2014, vol. 8, pp. 262-278.
7. Vershubskii A.V., Trubitsin B.V., Priklonskii V.I., Tikhonov A.N. Lateral heterogeneity of the proton potential along the thylakoid membranes of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017, vol. 1859, pp. 388-401.
8. Trubitsin B.V., Vershubskii A.V., Priklonskii V.I., Tikhonov A.N. Short-term regulation and alternative pathways of photosynthetic electron transport in *Hibiscus rosa-sinensis* leaves. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2015, vol. 152, pp. 400-415.
9. Kuvykin I.V., Ptushenko V.V., Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. Regulation of electron transport in C₃ plant chloroplasts *in situ* and *in silico*. Short-term effects of atmospheric CO₂ and O₂. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, vol. 1807, pp. 336-347.
10. Vershubskii A.V., Kuvykin I.V., Priklonskii V.I., Tikhonov A.N. Functional and topological aspects of pH-dependent regulation of electron and proton transport in chloroplasts *in silico*. *BioSystems*, 2011, vol. 103, pp. 164-179.
11. Tikhonov A.N. Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: An overview. *Photosynth Res.*, 2015, vol. 125, pp. 65-94.
12. Tikhonov A.N. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.*, 2013, vol. 116, pp. 511-534.
13. Вершубский А.В., Тихонов А.Н. pH-зависимая регуляция электронного и протонного транспорта в хлоропластах *in situ* и *in silico*. *Биологические мембраны*, 2019, т. 36, № 4, с. 242-254. [Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. pH-dependent regulation of electron and proton transport in chloroplasts *in situ* and *in silico*. *Biologicheskie membrany*, 2019, vol. 36, no. 4, pp. 242-254. (In Russ.)]
14. Вершубский А.В., Тихонов А.Н. Электронный транспорт и трансмембранный перенос протонов в фотосинтетических системах оксигенного типа *in silico*. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 1, с. 75-89. [Vershubskii A.V., Tikhonov A.N. Electron transport and transmembrane proton transfer in photosynthetic systems of oxygenic type *in silico*. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 60-71.]

MATHEMATICAL MODELING OF THE LIGHT-INDUCED PROCESSES REGULATION OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS

Vershubskii A.V., Tikhonov A.N.

Moscow Lomonosov State University

Moscow, 119991, Russia; e-mail: an_tikhonov@mail.ru

Abstract. This report presents the results of theoretical studies on the mathematical description of photosynthetic electron transport, proton transport and ATP synthesis in the framework of our comprehensive mathematical model of light induced processes of oxygenic photosynthesis. The model takes into account the key stages of electron and proton transport in chloroplasts associated with ATP synthesis, as well as the processes of regulation of light stages of photosynthesis in chloroplasts of higher plants and in cyanobacteria cells. One of the features of our model is that it considers the functioning of both photosynthetic and respiratory chain of electronic transport. The analysis of numerical experiments allowed us to identify the factors responsible for the appearance of complex multiphase kinetics of electronic transport, depending on the structural features of the photosynthetic apparatus and the conditions of the photosynthetic apparatus (lateral heterogeneity of thylakoid membranes, the presence of alternative electron transport paths, variation of the gas composition of the medium and light intensity).

Key words: photosynthesis, electron and proton transport, mathematical modeling.

ПОКРЫТИЕ ЛИПОСОМ ХИТОЗАНОМ И ИХ МУКОАДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА

Горбач В.И., Ермак И.М., Давыдова В.Н.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
пр. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: vikdavidova@yandex.ru; vigorbach@bk.ru
Поступила в редакцию: 23.07.2019

Аннотация. Получены нейтральные (НЛ) и анионные липосомы (АЛ) покрытые хитозаном. Определены их размер и ζ -потенциал. НЛ представляли собой частицы с узким молекулярно-массовым распределением и средним диаметром $435,6 \pm 59,9$ нм. АЛ были более гетерогенными со средним диаметром $525,8 \pm 76,3$. Покрытие хитозаном способствовало перезарядке липосом. В случае НЛ было достаточно 100 мкг/мл хитозана, чтобы получить положительно заряженные частицы. АЛ покрытые хитозаном показывали изменение заряда, пропорционально концентрации добавленного полисахарида: при инкубации с раствором хитозана в концентрации 100 мкг/мл их заряд нейтрализовался только частично. Положительно заряженные липосомы были получены при инкубации с раствором хитозана с концентрацией 400 мкг/мл. Показано, что липосомы покрытые хитозаном проявляют мукоадгезивные свойства, прикрепляясь к слизистой поверхности ткани кишечника, причем этот процесс зависит от времени. После 5 мин инкубации к поверхности слизистой прикрепляется около 10% НЛ и АЛ. Увеличение времени инкубации до 60 мин количество адгезированных липосом возрастает. При этом активность НЛ была в 2 раза выше, чем АЛ.

Ключевые слова: липосомы, хитозан, ζ -потенциал, мукоадгезивные свойства.

Липосомы представляют собой бислойные искусственные частицы, образующиеся при механическом воздействии на дисперсию холестерина и фосфолипидов в водном растворе. Благодаря своим размерам и биосовместимости липосомы являются одним из перспективных способов доставки лекарственных препаратов. Включение активной субстанции в липосомальную матрицу защищает ее от преждевременного воздействия агрессивных среды ЖКТ и действия ферментов, наряду с этим облегчает проникновение в клетку.

Липосомы, получаемые путем механического воздействия на липидную пленку, представляют собой гетерогенную суспензию, поэтому к настоящему времени разработаны различные методы, позволяющие получать более однородные препараты. Для этого используют центрифугирование, хроматографию, а также пропускание суспензии липосом через мембраны с различными размерами пор на специальных приборах – экструдерах, что позволяет получать как очень мелкие липосомы, размерами 50-100 нм, так и частицы средних размеров порядка 200-500 нм. Липосомы такого размера достаточно легко выделяются на обычных лабораторных центрифугах и могут содержать в своем объеме разнообразные биологически активные соединения для адресной доставки к клеткам или органам человека. Нами проводятся исследования по включению в липосомы, разработанного в ТИБОХ ДВО РАН препарата «Гистохром®», получаемого из экстракта морских ежей, и его комплексов с полисахаридами красных водорослей для создания на их основе препаратов, которые могут быть использованы в кардиологии, офтальмологии, а также при заболеваниях желудочно-кишечного тракта [1].

Свойства липосом могут значительно варьировать в зависимости от липидного состава, поверхностного заряда, размера и способа приготовления. Часто в состав фосфолипидной смеси включают анионные или катионные гидрофобные соединения, например, дицетилфосфат (ДЦФ) или цетиламин, что позволяет получать отрицательно- или положительно-заряженные липосомы. Присутствие заряженных молекул приводит к увеличению общего объема водной фазы во внутреннем пространстве липосомы (в результате отталкивания соседних бислоев) и уменьшению вероятности агрегации липосом после их приготовления. Увеличенный объем внутренней фазы липосом в свою очередь позволяет увеличить дозу загружаемого лекарственного средства. Однако, катионные липосомы могут иметь цитолитическую и цитотоксическую активность. Так, например, катионные липосомы, содержащие стеариламин, были токсичными для кроликов, поскольку вызывали гемолиз эритроцитов [2]. В тоже время положительно заряженные липосомы проявляют большую способность к взаимодействию с клетками организма, что позволяет увеличить вероятность включения активной субстанции непосредственно в клетки [3].

Альтернативным способом получения положительно заряженных липосом служит их покрытие природными полимерами, в частности полисахаридом хитозаном. Хитозан представляет собой биосовместимый катионный полисахарид, состоящий из остатков 1,4-связанного D-глюкозамина, часть которого ацетилирована по аминогруппе. Этот полисахарид показывает хорошие мукоадгезивные свойства, обладая способностью удерживаться на слизистых оболочках различных тканей макроорганизма.

Целью данной работы было получение липосом различного состава (нейтральных и анионных), покрытие их хитозаном, определение физико-химических характеристик и сравнительная оценка мукоадгезивных свойств полученных липосом.

Нейтральные и анионные липосомы были получены при обработке ультразвуком липидной пленки, состоящей из яичного лецитина и холестерина (нейтральные липосомы (НЛ)) или лецитина, холестерина и ДЦФ

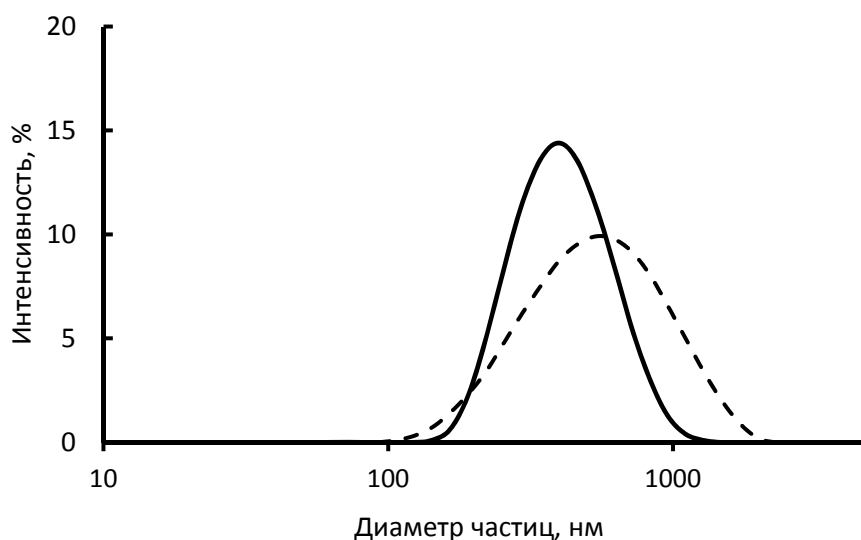


Рисунок 1. Распределение НЛ (сплошная линия) и АЛ (пунктирная линия) по размерам

(анионные липосомы (АЛ)). Для получения более гомогенных препаратов частицы были пропущены через экструдер с размером пор 0,4 мкм и охарактеризованы методом динамического рассеяния света (ДРС) (рис. 1). Как можно видеть из рисунка, НЛ представляли собой частицы с узким молекулярно-массовым распределением (индексом полидисперсности (ИП) – $0,153 \pm 0,042$) и средним диаметром $435,6 \pm 59,9$ нм. АЛ были более гетерогенными – их ИП составил $0,263 \pm 0,019$ со средним диаметром $525,8 \pm 76,3$.

Для покрытия липосом из панциря камчатского краба нами получен хитозан с помощью щелочной обработки. Согласно данным ^1H -ЯМР-спектроскопии полисахарид содержал около 4% N-ацетатных групп. Для получения положительно заряженных частиц НЛ и АЛ были инкубированы с раствором хитозана в концентрации 100 или 400 мкг/мл. Согласно данным ДРС, покрытие липосом хитозаном не оказывало значительного влияния на их размер, хотя ИП незначительно увеличивался.

Поверхностный заряд (ζ -потенциал) полученных липосом, представленный в таблице 1, зависел от количества нанесенного на них хитозана.

НЛ и АЛ в дистиллированной воде имели отрицательное значение поверхностного потенциала. Отрицательный заряд для липосом, содержащих в своем составе нейтральные фосфолипиды был зарегистрирован ранее в работах других исследователей [4]. Покрытие хитозаном приводило к перезарядке липосом. В случае НЛ было достаточно 100 мкг/мл хитозана, чтобы получить положительно заряженные частицы. При увеличении концентрации полисахарида до 400 мкг/мл заряд липосом также увеличивался и достигал $+43,9 \pm 1,2$ мВ.

Липосомы, содержащие ДЦФ, при покрытии хитозаном показывали изменение заряда, пропорционально концентрации добавленного полисахарида: при инкубации с раствором хитозана в концентрации 100 мкг/мл их заряд был нейтрализован только частично и становился равным – 19,5 мВ. Положительно заряженные липосомы были получены при инкубации с раствором хитозана с концентрацией 400 мкг/мл.

Одним из требований, предъявляемых к пероральным лекарственным формам является наличие у них мукоадгезивных свойств. Для сравнительной оценки мукоадгезивных свойств исходных и покрытых хитозаном липосом была использована свежемороженая слизистая ткань тонкого кишечника свиньи и липосомы, содержащие флуоресцентную метку – сульфородамина В натриевую соль. Для оценки способности липосом прикрепляться и удерживаться на слизистой оболочке суспензию наносили на поверхность слизистой ткани кишечника и инкубировали при 25°C в течение 1 часа, после чего ткань промывали и обрабатывали смесью вода/бутанол (1:1 об/об) центрифугировали и определяли флуоресценцию водного слоя.

Таблица 1. Значения ζ -потенциала липосом

Образец	ζ -потенциал, mV
Нейтральные липосомы	$-24,5 \pm 1,5$
Нейтральные липосомы + ХН (100 мкг)	$+27,4 \pm 0,1$
Нейтральные липосомы + ХН (400 мкг)	$+43,9 \pm 1,2$
Отрицательные липосомы	$-26,5 \pm 1,1$
Отрицательные липосомы + ХН (100 мкг)	$-19,5 \pm 0,8$
Отрицательные липосомы + ХН (400 мкг)	$+20,1 \pm 0,4$

На основании полученных данных рассчитывали % липосом, прикрепившихся к поверхности слизистой ткани по формуле (1):

$$A = \frac{F_1}{F_0} 100\% \quad (1)$$

где A – % прикрепившихся липосом; F_0 – флуоресценция водного экстракта лизированной суспензии исходных липосом; F_1 – флуоресценция водного экстракта после инкубации с тканью.

Полученные данные представлены на рисунке 1.

Как можно видеть из рисунка 2 липосомы проявляют мукоадгезивные свойства, прикрепляясь к слизистой поверхности ткани кишечника, причем этот процесс зависит от времени. После 5 мин инкубации к поверхности слизистой прикрепляется около 10% НЛ и АЛ. Увеличение времени инкубации до 60 мин количество адгезированных липосом возрастает. При этом активность НЛ в 2 раза выше, чем АЛ. Как известно, гликопротеины или муцины – основные компоненты слизистых оболочек – при физиологических pH заряжены отрицательно, что вероятно препятствует связыванию АЛ со слизистой. Обработка обеих типов липосом хитозаном повышает их способность прикрепляться и удерживаться на поверхности слизистой ткани, что может быть связано с мукоадгезивными свойствами самого хитозана, который обладает выраженной способностью связываться со слизистыми оболочками различных тканей млекопитающих [5]

Мукоадгезивный эффект у анионных липосом, покрытых хитозаном почти в 1,5 раза выше, чем у нейтральных. Можно предположить, что в случае липосом, содержащих в своем составе ДЦФ, хитозан нанесенный на их поверхность удерживается более прочно за счет электростатических сил взаимодействия между аминогруппами поликатиона и фосфатными группами на поверхности липосом. Поскольку сам полисахарид обладает высокой способностью связываться мукусом, это может служить причиной высокой адгезии АЛ, покрытых хитозаном, к тканевой поверхности. В тоже время при нанесении хитозана на поверхность нейтральных липосом, полисахарид удерживается в основном за счет водородных связей, и может частично удаляться с их поверхности при инкубации с тканью кишечника. В результате чего, липосомы, лишённые хитозана удаляются со слизистой.

Таким образом, в результате покрытия НЛ и АЛ хитозаном получены положительно заряженные липосомы, характеризующиеся узким молекулярно-массовым распределением. Покрытие липосом полисахаридом изменяет их заряд и увеличивает способность взаимодействовать с тканями организма.

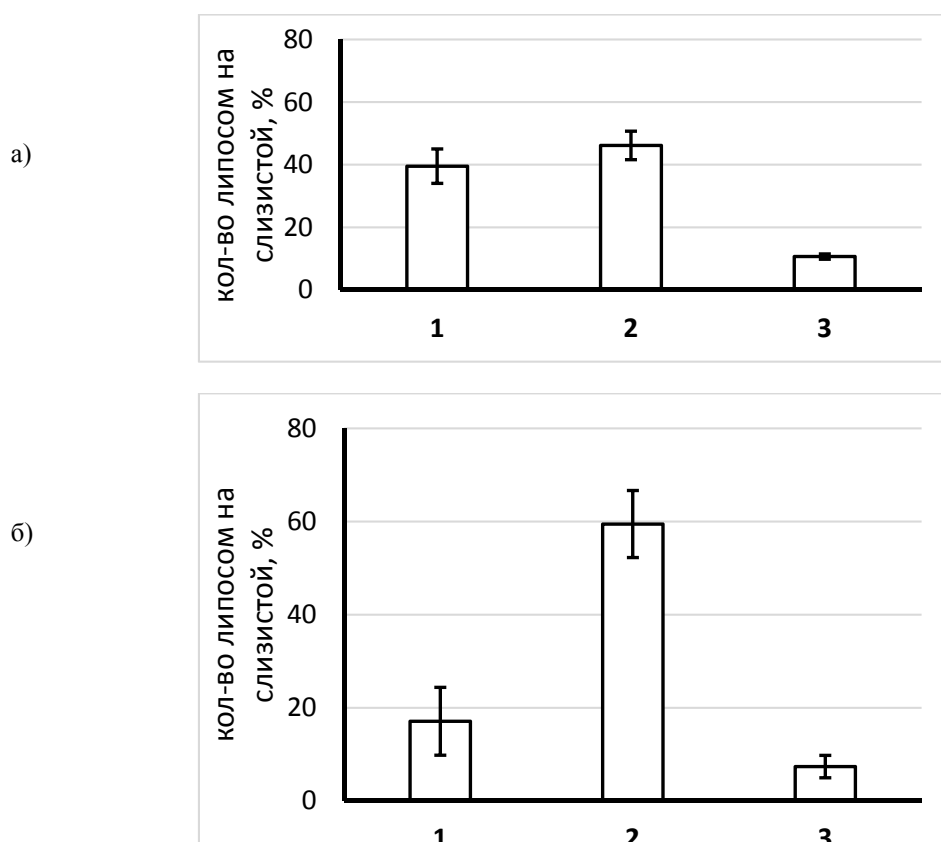


Рисунок 2. Количество нейтральных (а) и анионных (б) липосом, прикрепленных к поверхности муцинового слоя кишечника. 1 – исходные липосомы, инкубированные со слизистой 1 ч; 2 – липосомы, покрытые хитозаном, инкубированные со слизистой 1 ч; 3 – липосомы, покрытые хитозаном, инкубированные со слизистой 5 мин.

Экспериментальная часть.

Холестерин, дицетилфосфат, сульфородамин В натриевая соль (CP) получены из фирмы Sigma – Aldrich (USA).

Лецитин был получен из яичного желтка после осаждения ацетоном, экстракции и очистки препаративной колоночной хроматографией на окиси алюминия по методу [6].

Получение липосом. К 0,18 мл раствору лецитина (10%) добавляли 0,1 мл раствора холестерина (83,4 мг/1мл) для нейтральных липосом и дополнительно 0,1 мл ДЦФ (7,2 мг/мл) для кислых липосом в смеси хлороформ-метанол 9/1 об/об, упаривали на ротормном испарителе и далее сушили в вакууме ротормного насоса 3 часа. Готовили универсальный физиологический буфер – NaOAc x 3 H₂O, MES, HERES, Tris, глицин, 0,1 M NaCl с pH 6.0. К полученным липидным пленкам добавляли 0,5 мл раствора CP (2 мг/мл) разведенного в 10 раз с буфером. Смесь озвучивали на ультразвуковой бане (37 Кгц) 5 минут, отмывали от невключенного в липосомы красителя центрифугированием 3 раза с 2 мл буфера 20 мин при 15000 g. Осадок липосом суспендировали в 3,0 мл буфера, пропускали на экструдере порциями по 1 мл через мембрану 0,4 мкм 10 раз. К половине суспензии добавляли 0,3 мл воды, к другой 0,3 мл раствора хитозана в буфере (0,2 мг/мл или 0,4 мг/мл), выдерживали в темноте 1,5 часа, разбавляли буфером до 4 мл.

Размеры липосом, индекс их полидисперсности и значения ζ -потенциала были определены с использованием ZetaSizer NanoZS (Malvern, UK) при 633 нм [1].

Для изучения адгезивных свойств липосом свежемороженную ткань тонкого кишечника свиньи размораживали при комнатной температуре в ФБР (pH 7,2), навеску ткани массой около 0,5 г помещали в чашки Петри (d = 40 мм), наливали сверху 0,4 мл суспензии липосом, выдерживали 1 час в темноте, сливали суспензию. Оставшуюся ткань промывали 5 раз водой, подсушивали фильтровальной бумагой, измельчали, переносили в пробирки объемом 1,5 мл. Добавляли 0,4 мл воды и 0,4 мл н-бутанола, обрабатывали ультразвуком 20 мин для разрушения адгезированных липосом, измеряли количество выделившегося CP в водной фазе на спектрофлуориметре (Microplate Fluorescence Reader, FL-600, BIO-TEK Instrument, inc) в микропланшетах на 200 мкл в сравнении с общим количеством вносимого в эксперимент CP в липосомах при поглощении λ_{exc} 530 нм и испускании λ_{em} 590 нм.

Список литературы / References:

1. Yermak I.M., Gorbach V.I., Glazunov V.P., Kravchenko A.O., Mishchenko N.P., Pimenova E.A., Davydova V.N. Liposomal form of the echinochrome-carrageenan complex. *Marine Drugs*, 2018, vol. 16, no. 9, p. 324. DOI: 10.3390/md16090324
2. Turanskaya S.P., Turov V.V., Gorbyk P.P. Preparation of liposomes for targeted drug delivery/ *Surface*, 2009, no. 15, pp. 189-214. DOI: 10.15407/Surface
3. Liu D., Song Y.K. Cationic liposome--mediated transfection *in vivo* (review). *Gene Therapy and Molecular Biology*, 1998, vol. 2, pp. 59-68
4. Li N., Zhuang C., Wang M., Sun X., Nie S., Pan W. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, vol. 379, no. 1, pp. 131-138, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.020
5. Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V.V. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 2008, vol. 9, no. 7, pp. 1837-1842. DOI: 10.1021/bm800276d
6. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г. *Препаративная биохимия липидов*. М.: Наука, 1981, 259 с. [Bergelson L.D., Dyatlovitskaya E.V., Molotkovsky Yu.G. *Preparative biochemistry of lipids*. M.: Science, 1981, 259 p. (In Russ.)]

COATING LIPOSOMS WITH CHITOSAN AND THEIR MUCOADHESIVE PROPERTIES

Gorbach V.I., Yermak I.M., Davydova V.N.

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS

pr. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: vikdavidova@yandex.ru; vigorbach@bk.ru

Abstract. Neutral (NL) and anionic liposomes (AL) coated with chitosan were prepared. Their size distribution and ζ -potential were determined. NL were particles with a narrow molecular weight distribution and an average diameter of 435.6 nm. AL were more heterogeneous with an average diameter of 525.8 nm. Chitosan coating led to liposome recharging. In the case of NL, 100 μ g / ml of chitosan was sufficient to obtain positively charged particles. AL coated with chitosan showed a change in charge depending on the concentration of the added polysaccharide. Incubation of liposomes with a chitosan solution at a concentration of 100 μ g/ml neutralized their charge only partially. Positively charged liposomes were obtained by incubation with chitosan solution at a concentration of 400 μ g/ml. It has been shown that liposomes coated with chitosan exhibit mucoadhesive properties, attaching to the mucosal surface of the intestinal tissue, and this process depends on time. After 5 minutes of incubation, about 10% NL and AL were attached to the mucosal surface. Increasing the incubation time to 60 minutes raised the amount of adhered liposomes. At the same time, the activity of NL was 2 times higher than that of AL.

Key words: liposomes, chitosan, ζ -potential, mucoadhesive properties.

ИНТЕГРАЦИЯ ДНК С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

Касьяненко Н.А., Варшавский М.С., Симанов Г.С., Бакулев В.М.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская набережная, 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. Интеграция ДНК с наночастицами благородных металлов позволяет получать разнообразные структуры с уникальными свойствами из-за синергетической активности обоих компонентов, которые дают возможность создания различных наноразмерных инструментов для применения в тераностике, биоэлектронике, при биокатализе, для зондирования, маркировки и доставки биологически активных агентов. Такие системы востребованы при построении различных трехмерных конструкций на основе технологий ДНК-оригами и ДНК-лего, что дает возможность создания композитных материалов с уникальными оптическими, физическими и электрохимическими свойствами. В таких структурах обычно используют принцип комплементарности оснований. Однако в последнее время стали использовать не только уникальные архитектурные свойства ДНК, но и ее конформационные возможности, обеспечивающие распознавание самых разнообразных мишеней (от ионов до белков и надмолекулярных структур) и формирование сложных комплексов с заданными свойствами. В работе на примере восстановления ионов серебра после образования их комплексов с азотистыми основаниями ДНК рассматривается процесс металлизации ДНК в растворе. Показано, что оптические свойства формируемых структур зависят от целого ряда факторов – от концентраций компонентов, способа смешивания и др. Рассматриваются спектральные свойства растворов, содержащих высокомолекулярную ДНК с наночастицами серебра, методами динамического светорассеяния и атомной силовой микроскопии анализируются размеры наночастиц, получаемых путем химического восстановления ионов серебра при использовании нитрата серебра. Проводится анализ влияния ДНК на состояние наночастиц в растворе.

Ключевые слова: наночастицы серебра, высокомолекулярная ДНК, металлизация ДНК.

Сопряжение серебряных наночастиц (НЧ) с молекулой ДНК и металлизация ДНК представляют собой весьма актуальные задачи. Благодаря своим уникальным свойствам, молекула ДНК в современных нанотехнологических разработках используется, главным образом, как матрица для создания различных наноразмерных структур, находящихся применение в медицине, оптике, электронике и др. В частности, управляемая регулярная посадка наночастиц на молекулу ДНК может позволить конструировать так называемые наноантенны, многократно усиливающие действие электромагнитного излучения в определенных точках. Такие исследования в настоящее время проводятся, в основном, на основе техники ДНК-оригами, которая использует свойство комплементарности азотистых оснований при самосборке различных конструкций. Такая технология является достаточно дорогостоящей. Использование высокомолекулярной природной ДНК дает дополнительные возможности при таких разработках. Во-первых, возможно создание достаточно протяженных конструкций [1, 2]. Во-вторых, специальный подбор условий восстановления серебра может упростить и удешевить изготовление таких систем.

Целью работы являлось определение оптимального способа формирования наночастиц серебра в водном растворе, содержащем ДНК, рассмотрение условий, приводящих к формированию нанокластеров серебра, сопоставление конформационных параметров ДНК при формировании таких систем.

Сегодня существует широкий спектр способов, позволяющих получить наночастицы серебра с теми или иными свойствами (например, частицы разной геометрии - наносферы, наностержни, нанопризмы и пр.) [2, 3]. Глобально можно выделить два основных подхода: физический (с применением лазерной абляции, испарения/конденсации и пр.) и химический (с применением восстановителей: цитрата или боргидрида натрия, а также различных биоагентов (green synthesis)). В работе используется хорошо известный метод химического восстановления ионов серебра в растворе нитрата серебра AgNO_3 при добавлении боргидрида натрия NaBH_4 .

В работе применяли как готовые наночастицы серебра, так и восстановление ионов серебра после формирования их комплексов с молекулой ДНК. Исследования проводили с помощью микроскопии, динамического светорассеяния, спектральных и гидродинамических методов, которые дают информацию о состоянии вторичной и третичной структуры ДНК.

Металлические наночастицы обнаруживают особые оптические свойства, которые определяются так называемыми плазмонами, отвечающими за локализованный поверхностный плазмонный резонанс [4, 5]. Для формируемых в работе НЧ пик плазмонного резонанса наблюдается при 388 нм (рис. 1). Наночастицы серебра получались путем смешивания растворов нитрата серебра (AgNO_3) и боргидрида натрия (NaBH_4). Последний выступает и в качестве восстановителя серебра, а также в качестве стабилизатора наночастиц, что важно из-за высокой активности серебра, приводящей к быстрому окислению и агрегации формируемых наночастиц. Ниже приведена реакция синтеза серебряных наночастиц с использованием боргидрида натрия:



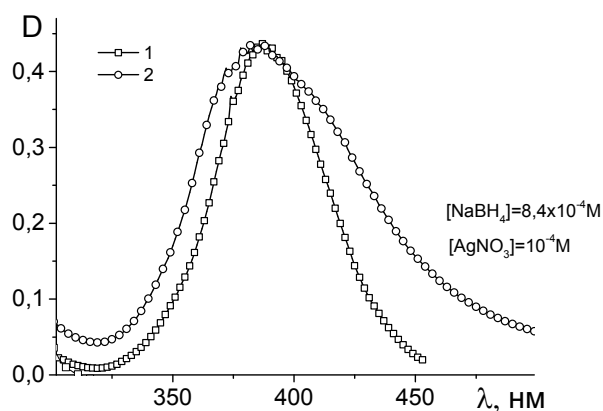


Рисунок 1. Пик плазмонного резонанса для формируемых в работе наночастиц серебра (1) и аналогичный пик после добавления в раствор ДНК (при смешивании равных объемов коллоидного раствора серебра и раствора ДНК в 0,005 М NaNO₃). С(ДНК) = 0,0015%. Измерения проведены через 15 минут после приготовления систем

Результат формирования наночастиц зависит от порядка смешивания реагентов, скорости смешивания, интенсивности смешивания и др. Необходимо использовать свежеприготовленный раствор боргидрида натрия (уже через 30 минут раствор боргидрида натрия показывает более низкую восстановительную активность из-за быстрого протекающего гидролиза в водной среде с формированием Na[B(OH)₄]).

Для характеристики спектральных свойств формируемых систем использовали спектрофотометр СФ-56 (ЛОМО, Россия). Использовали коммерческие химические реактивы марки хч (Вектон) и высокомолекулярную ДНК тимуса теленка (Sigma Aldrich). Молекулярную массу используемого образца ДНК (9×10^6) определяли вискозиметрически. Образец растворяли в дистиллированной воде, после 4 суток выдержки при температуре 4°C добавляли раствор NaNO₃ до достижения необходимой концентрации поддерживающего электролита (обычно 0,005 М). После фильтрования концентрацию ДНК в растворе определяли методом А.С. Спирина [6]. Спектры кругового дихроизма (КД) ДНК регистрировали с помощью автодихрографа Mark IV (Jobin Yvon, Франция). Измерения проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Для измерения размеров наночастиц использовали метод динамического рассеяния света (ДРС), который позволяет определить коэффициент поступательной диффузии частиц D путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света, из которого находили гидродинамический радиус частиц R по формуле Стокса-Эйнштейна: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$, где k_B – константа Больцмана; T – абсолютная температура и η – вязкость растворителя.

Использовали установку Photocor Complex (Россия).

Исследование структур проводили также с использованием атомного силового микроскопа NanoScope 4 и микроскопа NTEGRA. Измерения проводили в режиме прямого сканирования. При исследовании образцов ДНК и комплексов ДНК с наночастицами (ДНК-НЧ) и с нанокластерами (ДНК-НК) использовали подложки со свежесколотой поверхностью слюды. Для фиксации макромолекул ДНК на поверхность в раствор добавляли соль MgCl₂ в концентрации 5×10^{-4} М. Фиксация отрицательно заряженных макромолекул ДНК с отрицательно заряженной слюдяной поверхностью осуществляется через положительно заряженные ионы Mg²⁺. Отрицательный заряд образуется на слюдяной поверхности в процессе расщепления слоев. Заряд сохраняется в течение времени, необходимого для фиксации ДНК и комплексов ДНК-НЧ, ДНК-НК. Смешанные с MgCl₂ растворы наносили на подложку в объеме ~5 мкл, и спустя 3-и минуты подложка промывалась струей дистиллированной воды для удаления незафиксированных молекул. Затем образцы помещались в неплотно закрытые чашки Петри для высушивания. Стоит отметить, что НЧ фиксировались на слюдяную подложку без добавления каких-либо низкомолекулярных соединений. Для фиксации НЧ использовали метод высушивания коллоидного раствора НЧ пониженной концентрации. Пример изображения синтезируемых наночастиц представлен на рисунке 2. Коллоидный раствор сформированных наночастиц серебра использовали для изучения распределения частиц по размерам методом динамического светорассеяния (рис. 3). Этот метод позволяет получать информацию о коэффициентах поступательной диффузии частиц. При этом могут быть использованы как молекулярные растворы полимеров (частицы – макромолекулы в этом случае характеризуются значением гидродинамического радиуса (радиус сплошной сферы, которая имеет такой же коэффициент поступательной диффузии, как макромолекула), так и коллоидные растворы. Для наночастиц получаем реальный радиус сферической частицы (форма частиц определена с помощью атомной силовой микроскопии (АСМ)).

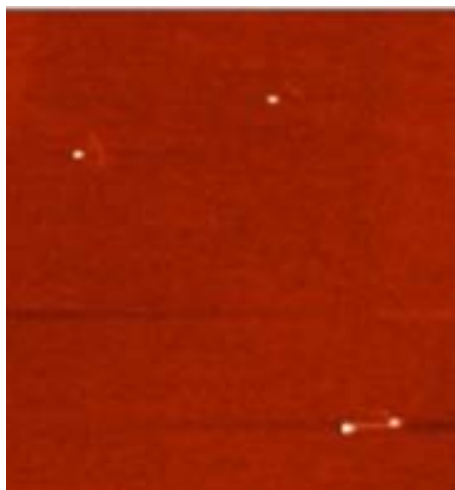


Рисунок 2. АСМ изображение наночастиц, высаженных на слюду (капля сильно разбавленного коллоидного раствора высыхала в вакуумном шкафу). Размер изображения 10 x 10 мкм

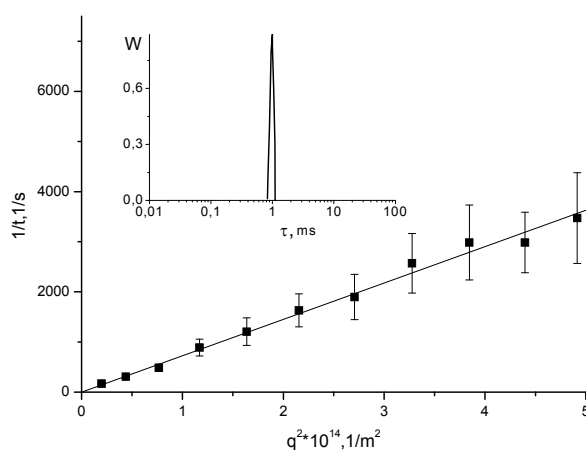


Рисунок 3. Результат исследования коллоидного раствора наночастиц серебра, полученных в работе методом химического восстановления, методом динамического светорассеяния. Из наклона зависимости скорости релаксации $1/\tau$ от q^2 (q - величина волнового вектора) получен коэффициент поступательной диффузии частиц. Вставка показывает распределение по временам релаксации. Гидродинамический радиус формируемых наночастиц равен 7,5 нм

При добавлении наночастиц серебра в раствор ДНК мы не наблюдаем смещения пика плазмонного резонанса (рис. 1), но его неоднородное уширение свидетельствует о появлении второй фракции частиц, связанных с ДНК (длинноволновое «плечо» свидетельствует о неразрешенной полосе около 425 нм). С течением времени картина меняется (рис.4). Заметим, что в этом опыте мы использовали большую концентрацию ДНК. Отчетливо виден сдвиг полосы плазмонного резонанса наночастиц при добавлении в раствор ДНК (спектры 4 и 5 на рис. 4).

Перейдем к рассмотрению результатов восстановления ионов серебра в растворах ДНК после их связывания с макромолекулой. Во всех растворах ДНК присутствовала соль $NaNO_3$ в концентрации 0,005 М в качестве поддерживающего электролита для ДНК. Образование комплексов ионов серебра с азотистыми основаниями ДНК в большой бороздке по позиции N7 гуанина [7] сопровождается характерным изменением спектра поглощения макромолекулы (рис. 4, спектр 2): происходит батохромный сдвиг максимума поглощения ДНК, свидетельствующий о связывании ионов серебра в большой бороздке ДНК с N7 гуанина.

С увеличением концентрации серебра в растворе наблюдается гиперхромный эффект. При локальном нарушении водородных связей в паре гуанин-цитозин ионы серебра располагаются между основаниями, связываясь с N3 цитозина. Добавление восстановителя после формирования комплексов приводит к появлению выраженного пика плазмонного резонанса (спектр 3 на рис. 4). В этом случае пик уширен и сдвинут в красную область относительно пика плазмонного резонанса свободных наночастиц серебра (спектр 5). Сдвиг пика однозначно свидетельствует о связывании формируемых наночастиц с ДНК. Полоса поглощения ДНК (спектральная область до 300 нм) при этом свидетельствует о наличии контактов серебра с азотистыми основаниями макромолекулы.

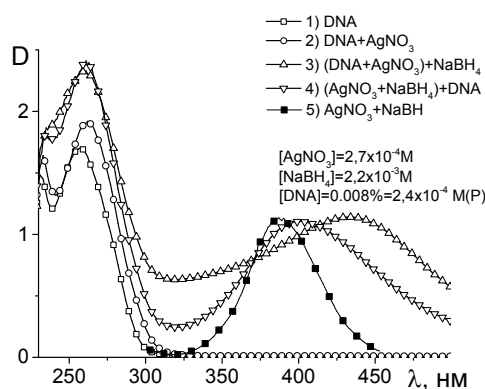


Рисунок 4. Спектры поглощения растворов ДНК (1), ее комплексов с ионами серебра до (2) и после (3) добавления восстановителя, после смешивания растворов ДНК и готовых наночастиц (4) и пик плазмонного резонанса свободных наночастиц (5). Концентрации и порядок добавления компонентов указаны на рисунке

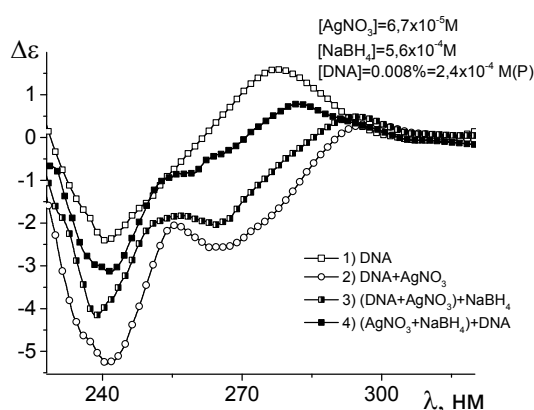


Рисунок 5. Спектры кругового дихроизма свободной ДНК (1), ДНК в комплексах с ионами серебра до (2) и после (3) добавления восстановителя. Приведен также спектр КД ДНК в растворе после добавления готовых наночастиц ДНК (4). Концентрации и порядок добавления компонентов указаны на рисунке

Следует подчеркнуть, что восстановление серебра после формирования комплексов ионов серебра с азотистыми основаниями макромолекулы протекает существенно медленнее (более 1 часа при комнатной температуре), чем при добавлении восстановителя в раствор нитрата серебра (реакция идет несколько минут). При добавлении же ДНК в систему спустя 5 минут после восстановителя (после формирования наночастиц) равновесие наступает достаточно быстро.

Спектры кругового дихроизма ДНК для систем ДНК с наночастицами (рис. 5) показывают, что при восстановлении серебра на ДНК макромолекула частично возвращается в состояние, наблюдаемое до связывания с ионами серебра.

Известно, что при восстановлении серебра в растворах ДНК, содержащих малые концентрации нитрата серебра (при недостатке ионов серебра относительно количества связывающих центров - пар оснований ДНК) в системе формируются не наночастицы серебра, демонстрирующие ярко выраженный плазмонный резонанс, фиксируемый спектрально в области около 400 нм, а так называемые нанокластеры (НК) – существенно меньшие металлические частицы серебра, локализованные на ДНК, не показывающие плазмонного резонанса [8, 9]. Подчеркнем, что они расположены именно на ДНК, хотя невозможно полностью исключить возможность их существования в растворе независимо от присутствия макромолекул.

На рисунке 6 приведены спектры поглощения тройной системы, приготовленной с использованием малых концентраций нитрата серебра. Для сравнения представлены также спектры поглощения свободной ДНК и ДНК в комплексе с ионами серебра. Следует обратить внимание на отсутствие видимого гиперхромного эффекта при связывании ионов серебра с ДНК в этом случае, хотя bathochromный сдвиг максимума поглощения ДНК свидетельствует о формировании комплексов. Обращает на себя внимание также отсутствие пика плазмонного резонанса в такой системе (спектр 3 на рис. 6), тогда как добавление ДНК в раствор готовых наночастиц при использовании тех же концентраций нитрата серебра и боргидрида натрия не влияет на выраженный пик плазмонного резонанса. Остается заключить, что практически все ионы серебра в растворе ДНК до добавления восстановителя находятся в связанном с макромолекулой состоянии, но из недостатков не позволяет формировать наночастицы, сопряженные с ДНК.

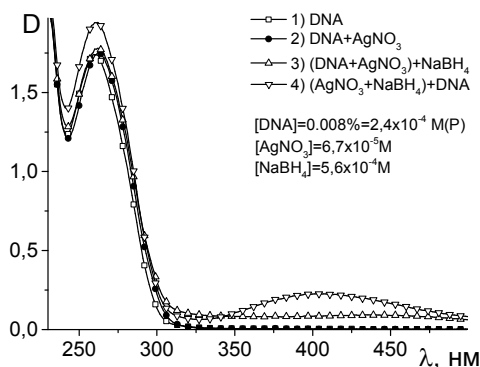


Рисунок 6. Спектры поглощения свободной ДНК (1), ДНК в комплексах с ионами серебра до (2) и после (3) добавления восстановителя. Приведен также спектр поглощения раствора готовых наночастиц после добавления в него ДНК (4). Концентрации и порядок добавления компонентов отмечены на рисунке

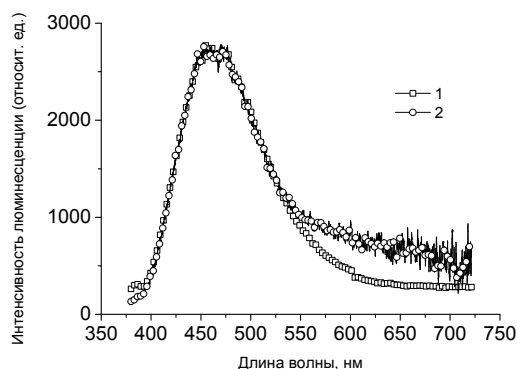


Рисунок 7. Спектры люминесценции раствора ДНК с нанокластерами при $\lambda_{ex}=340$ нм (1) и 270 нм (2)

Заметим, что формируемые при этом малые частицы серебра – нанокластеры способны люминесцировать [8-10]. При возбуждении в области поглощения ДНК ($\lambda_{ex} = 270$ нм) наблюдается нехарактерный для ДНК спектр флуоресценции с максимумом около 460 нм и длинноволновым «хвостом», простирающимся за 720 нм (рис. 7).

В спектре возбуждения флуоресценции ($\lambda_{em} = 460$ нм) (рис. 8) проявляются две полосы: основная с максимумом на 365 нм и более слабая полоса с максимумом 270 нм. Основная полоса находится в области плазмонного резонанса (рис. 9), поэтому ее можно приписать фракции наночастиц. При возбуждении в этой полосе ($\lambda_{ex} = 340$ нм) спектр флуоресценции практически не меняется: полуширина и максимум остаются такими же, как и при возбуждении 270 нм, но длинноволновый хвост исчезает (см. рис. 7, спектр 1).

Известно, что максимум в спектре возбуждения ДНК сдвинут в длинноволновую сторону на 10-20 нм относительно максимума в ее спектре поглощения. На основании этого можно приписать вторую более слабую полосу с максимумом 270 нм поглощению ДНК. Появление поглощения ДНК в спектре возбуждения наночастиц можно объяснить переносом энергии возбуждения с ДНК на связанные с ней люминесцирующие наночастицы. Квантовый выход флуоресценции данных наночастиц должен быть очень высоким, так как их люминесценция наблюдается при очень незначительном поглощении в области плазмонного резонанса (очень низкая концентрация наночастиц).

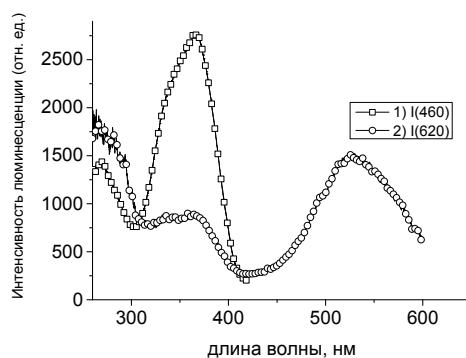


Рисунок 8. Спектры возбуждения флуоресценции $\lambda_{em} = 460$ (1) и 620 нм (2)

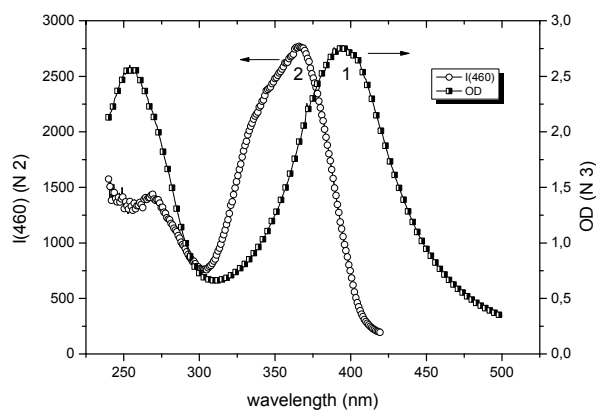


Рисунок 9. Спектр поглощения раствора 3 (синий) и спектр возбуждения при $\lambda_{\text{exc}} = 460$ нм раствора 2. Растворы 2 и 3 готовили одинаковым способом, но концентрации AgNO_3 и NaBH_4 в растворе 3 больше в 4 раза по сравнению с раствором 2

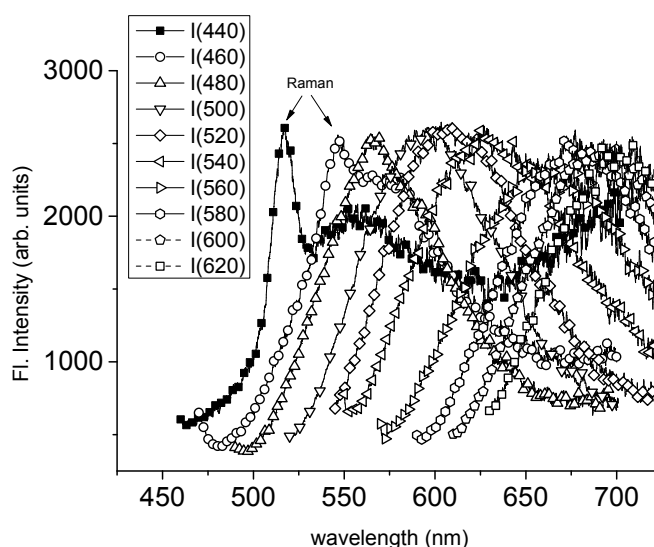


Рисунок 10. Спектры люминесценции раствора ДНК с нанокластерами серебра при возбуждении в длинноволновой области. Длины волн возбуждения указаны на рисунке

При регистрации слабой люминесценции в красной области (600-700 нм) в спектре возбуждения кроме выявленных полос с максимумами 270 и 365 нм проявляется еще одна более длинноволновая полоса. В отличие от полосы 365 нм, максимум этой длинноволновой полосы сдвигается при изменении длины волны регистрации (и наоборот, положение максимума спектра испускания зависит от длины волны возбуждения – см. рис. 10). Такие зависимости говорят о многокомпонентности люминесцирующей системы – каждой отдельной фракции соответствует своя полоса поглощения и своя полоса испускания. Ранее в аналогичных системах наблюдалась подобная люминесценция, которая была приписана флуоресценции адсорбированных на ДНК кластеров серебра [8, 9]. Таким образом, по изучению люминесценции можно сделать вывод о том, что в растворе присутствуют две люминесцирующие фракции: адсорбированные на ДНК малые частицы серебра с максимумом поглощения 365 нм и максимумом испускания 460 нм, и кластеры серебра различной структуры со спектрами поглощения в области 460-620 нм и испусканием 460-750 нм.

Заметим, что если мы добавляли ДНК к готовым наночастицам, которые получали, сливая раствор нитрата серебра и боргидрида натрия, мы вообще не наблюдали ни один из приведенных выше спектров люминесценции. Из этого можно сделать вывод, что люминесцирующие состояния серебра образуются только при восстановлении адсорбированных на цепи ДНК ионов серебра, а добавление ДНК в раствор с уже восстановленным серебром не дает такого эффекта.

АСМ изображение высаженной на слюду ДНК после восстановления серебра до состояния нанокластеров показало, что в этой системе также присутствуют наночастицы серебра (рис. 11). Возможно, они усиливают люминесценцию нанокластеров.

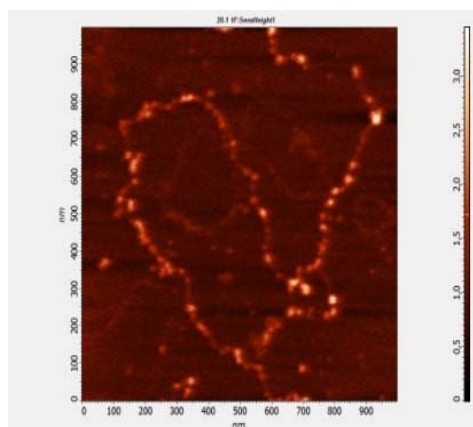


Рисунок 11. АСМ изображение ДНК на слюде после восстановления серебра с формированием нанокластеров. Использовали микроскоп NTEGRA

Таким образом, в работе показано, что возможен синтез наночастиц серебра, связанных с ДНК. При синтезе наночастиц в растворе ДНК, содержащем нитрат серебра, только часть ионов находится в связанном с ДНК состоянии, а остальные ионы остаются свободными. В этом случае часть формируемых наночастиц связана с макромолекулой, а остальные находятся в растворе в свободном состоянии. При малых концентрациях ионов серебра в растворе ДНК формируются люминесцирующие кластеры. Таким образом, подбирая концентрации ДНК, нитрата серебра и восстановителя, можно получить разные системы – сопряженные ДНК наночастицы, обладающие плазмонным резонансом, или располагающиеся на ДНК более маленькие люминесцирующие нанокластеры.

Список литературы / References:

1. Puchkova A.O., Sokolov P.A., Kasyanenko N.A., Petrov Y.V. Metallization of DNA on silicon surface. *Journal of Nanoparticle Research*, 2011, vol. 13, no. 9, pp. 3633-3641. DOI: 10.1007/s11051-011-0282-6.
2. Kasyanenko N., Varshavskii M., Ikonnikov E., Tolstyko E., Belykh R., Sokolov P., Bakulev V., Rolich V., Lopatko K. DNA modified with metal nanoparticles: preparation and characterization of ordered metal-DNA nanostructures in a solution and on a substrate. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 3237250. DOI: 10.1155/2016/3237250.
3. Sun Y., Xia Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 2002, vol. 298, no. 5601, pp. 2176-2179. DOI: 10.1126/science.1077229.
4. Maier S.A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer, Berlin, 2007, 345 p.
5. Ghosh S.R., Nath S., Kundu S., Esumi K., Pal T. Ligand Effects on the Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) of Gold Colloids. *Journal of Physical Chemistry B*, 2004, vol. 108, no. 37, pp. 13963-1397. DOI: 10.1021/jp047021q.
6. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот. *Биохимия*, 1958, т. 23, с. 656-662. [Spirin A.S. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. *Biokhimiya (USSR)*, 1958, vol. 23, pp. 656-662. (In Russ.)]
7. Касьяненко Н.А., Qiushi Z., Варшавский М.С., Бакулев В.М., Демидов В.Н. Металлокомплексы ДНК и металлизация макромолекулы в растворе. *Журнал структурной химии*, 2017, т. 58, № 2, с. 424-430. DOI: 10.15372/JSC20170227 [Kasyanenko N.A., Qiushi Z., Varshavskii M.S., Bakulev V.M., Demidov V.N. DNA metal complexes and metallization of a macromolecule in solution. *Journal of Structural Chemistry*, 2017, vol. 58, no. 2, pp. 406-412. DOI: 10.1134/S0022476617020275.]
8. Yeh H.-C., Sharma J., Han J.J., Martinez J.S., Werner H. A DNA-Silver Nanocluster Probe That Fluoresces upon Hybridization. *Nano Lettres*, 2010, vol. 10, no. 8, pp. 3106-3110. DOI: 10.1021/nl101773c.
9. Díez I., Ras R.H.A. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 2011, vol. 3, pp. 1963-1970. DOI: 10.1039/C1NR00006C.
10. Volkov I.L., Ramazanov R.R., Ubyivovk E.V., Rolich V.I., Kononov A.I., Kasyanenko N.A. Fluorescent silver nanoclusters in condensed DNA. *Chemphyschem: European journal of chemical physics and physical chemistry*, 2013, vol. 14, no. 15, pp. 3543-3550. DOI: 10.1002/cphc.201300673.

DNA INTEGRATION WITH METAL NANOPARTICLES

Kasyanenko N.A., Varshavskii M.S., Simanov G.C., Bakulev V.M.

St. Petersburg State University

University Embankment 7-9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Abstract. Integration of DNA with nanoparticles of noble metals makes it possible to obtain various structures with unique properties due to the synergistic activity of both components, which make it possible to create various nanoscale tools for use in theranostic, bioelectronics, biocatalysis, for probing, labeling and delivering biologically active agents. Such systems useful when building various three-dimensional constructions based on DNA origami and DNA-Lego technologies, which makes it possible to create composite materials with unique optical, physical and electrochemical properties. In such structures, the principle of base complementarity is usually used. Recently, however, investigators began to use not only unique architectural properties of DNA, but also the conformational capabilities of DNA, that ensure recognition of a wide variety of targets (from ions to proteins and supramolecular structures) for the formation of complexes with desired properties. The reduction of silver ions after the formation of their complexes with nitrogenous bases of DNA is studied in this research. The process of DNA metallization in solution is considered. It is shown that the optical properties of the formed structures depend on a number of factors - on the concentrations of the components, on the method of mixing, etc. The spectral properties of solutions containing high-molecular DNA with silver nanoparticles were regarded. The dynamic light scattering method and atomic force microscopy to analyze the size of nanoparticles obtained by chemical reduction of silver ions using silver nitrate were used. The analysis of the influence of DNA on the state of nanoparticles in solution was carried out.

Key words: silver nanoparticles, high molecular DNA, DNA metallization.

СВЯЗЫВАНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА С МЕЛАНИНАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Турабова Г.А., Багирова О.Ш.

Бакинский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. Из кожуры плодов бузины черной и плюща обыкновенного выделены меланины. Для идентификации выделенных пигментов зарегистрировали их ЭПР и ИК-спектры. Связывание ионов железа с данными меланинами исследовано методом гамма-резонансной спектроскопии (ГРС). Установлено, что меланины растительного происхождения эффективно хелатируют ионы железа как в его двух, так и в трехвалентном состоянии, причем, при взаимодействии с ионами Fe^{2+} меланины их частично окисляют до Fe^{3+} неактивных в прооксидантном отношении, и помимо ионов Fe^{2+} связывают и последние. Величины параметров ГР-спектров изученных образцов характерны для высокоспиновых (ВС) комплексов ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} с октаэдрическим лигандным окружением. Предполагается, что способность меланинов растительного происхождения эффективно связывать прооксидантные ионы Fe^{2+} может являться одним из возможных механизмов их антиоксидантных и радиопротекторных свойств.

Ключевые слова: меланин, комплексообразование с ионом железа, гамма-резонансная спектроскопия.

Меланины – темноокрашенные пигменты широко распространены в животном, растительном и микробном мире. Они представляют собой высокомолекулярные полимеры нерегулярной структуры, относящиеся к классу конденсированных фенольных соединений. До недавнего времени считалось, что меланины выполняют в живой клетке, главным образом, функции защитного экрана против УФ-излучения и ионизирующей радиации. Однако, неясной оставалась роль меланина, содержащегося в неосвещаемых тканях организма. К настоящему времени получен ряд важных данных об их физико-химических свойствах и биологической активности (полупроводниковые, электретные, радиопротекторные, антиоксидантные, противоопухолевые, электронно- и ионно-обменные, каталитические, участие в окислительно-восстановительных реакциях, способности к образованию КПЗ со многими электрофильными и нуклеофильными соединениями и т.д.), благодаря которым они стали объектом пристального внимания широких кругов исследователей [1-4].

Характерной особенностью меланинов является наличие высокостабильных парамагнитных центров, разнообразных функциональных групп, а также систем сопряженных связей в их молекулах. В этой связи представляет интерес получение координационных соединений меланина с металлами, в частности, с ионами железа, которые будут обладать свойствами, отличными от исходных, что позволит расширить круг их использования в науке, технике и медицине.

В представленной работе приводятся и обсуждаются результаты экспериментальных исследований комплексообразования ионов железа с меланинами, выделенными из кожуры плодов бузины черной (PM1) и плюща обыкновенного (PM2). Меланины выделены методом щелочной экстракции по ранее описанной методике с небольшой модификацией [1]. С целью идентификации полученных экстрактов регистрировали их ЭПР- и ИК-спектры (рис. 1 и рис. 2). ЭПР-спектры полученных пигментов представляют собой синглетную, слегка асимметричную линию с g-фактором приблизительно равным g-фактору свободного электрона ($2,003 \pm 0,001$) и шириной ~6,5 Гс. Вклад сверхтонких взаимодействий отсутствует. В ИК-спектрах наблюдается полосы

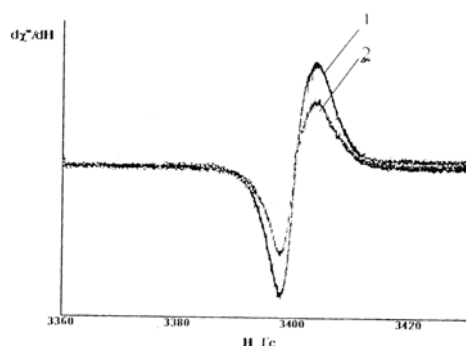


Рисунок 1. ЭПР- спектры выделенных пигментов
1 – PM1; 2 – PM2

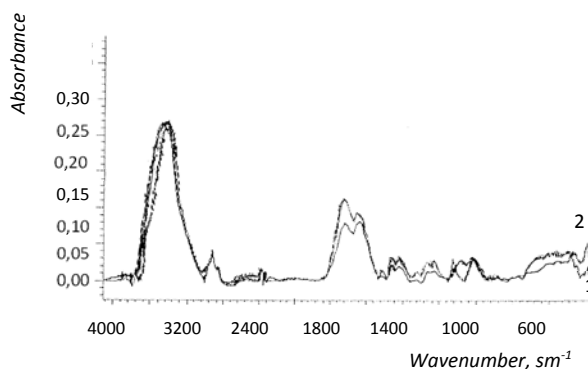


Рисунок 2. ИК-спектры выделенных пигментов
1 – PM1; 2 – PM2

поглощения характерные для групп: amino- и фенольные гидроксилы ($3500\div3300\text{ см}^{-1}$), карбонильной и карбоксильной группы ($1720\div1640\text{ см}^{-1}$), ароматические скелетные колебания C-H групп ($1420\div1400\text{ см}^{-1}$), валентные колебания C-O, C-C, C=O групп ($1260\div1220\text{ см}^{-1}$). Анализ параметров ЭПР- и ИК-спектров показал, что они хорошо согласуются имеющимися в литературе аналогичными данными [1, 2]. Это дает основание полагать, что выделенные нами пигменты являются меланинами.

Комплексные соединения ионов железа с растительными меланинами получали инкубированием свежевыделенного меланина (18 мг сухого веса) в 8 мл растворе $^{57}\text{FeSO}_4$ с концентрацией 0,23 мг/мл при комнатной температуре в течении 2 часов. Контрольные измерения показали, что pH системы в процессе инкубации не менялся. Полученные комплексы выделяли из суспензии центрифугированием при 5000g в течение 20 мин. После отделения супернатанта осадок дважды промывали дисциллированной водой с последующим центрифугированием. Во избежание окисления ионов Fe^{2+} в слабокислой среде в исходный раствор добавляли гидроксилламин ($(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$), сильнопрепятствующего агента образования окислов или гидроокислов железа. Предварительные опыты показали, что гидроксилламин не восстанавливает меланин. Раствор $^{57}\text{FeSO}_4$ получали растворением металлического $\alpha\text{-}^{57}\text{Fe}$ («Изотоп», Россия) в разбавленной (0,1M) H_2SO_4 (ХЧ) в инертной среде. Полученный раствор хранили под слоем гептана, добавив избыток нерастворенного металлического $\alpha\text{-}^{57}\text{Fe}$. Концентрацию ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли спектрофотометрически на спектрометре «SPECORD UV, VIS» (Германия), используя в качестве индикатора 0-фенантралин («SERVA», Германия) и роданид («ЧДА»), соответственно. Доля ионов Fe^{3+} в растворе $^{57}\text{FeSO}_4$ не превышала 1% от общего количества ионов железа. ГР-спектры изученных образцов регистрировали на установке MS2001, работающей в режиме постоянных ускорений. Источником резонансных γ -квантов служил изотоп ^{57}Co в матрице Ст. ГР-спектрометр откалибровывали по ГР-спектру $\alpha\text{-Fe}$.

На рисунке 3 приведены ГР-спектры при 80 К системы $^{57}\text{FeSO}_4$ + растительные меланины полученный при pH 5,7. Параметры ГР-спектров замороженных растворов изученных образцов при температуре 80 К представлены в таблице 1. Как видно из рисунка 3 и таблицы 1, ГР-спектры исходного раствора и супернатанта после осаждения идентичны по форме – это четкий дублет с параметрами, характерными для аквакомплексов Fe^{2+} . Осадок имеет сложный ГР-спектр, состоящий, по крайней мере, из четырех парциальных спектров: двух дублетов и двух секстетов с уширенными линиями. Широкий дублет доля которого составляет (18-25) % от общей площади спектра в зависимости от типа меланинов, по значениям параметров характерен для высокоспиновых (ВС) комплексов Fe. Отличие их параметров, главным образом КР, от параметров ГР-спектров исходного раствора указывает на связывание ионов Fe^{2+} с меланинами. Центральный узкий дублет доля которого составляет (9-13)% от общей площади спектра по значениям параметров характерен для парамагнитных ВС комплексов Fe^{3+} . Параметры секстетных парциальных спектров также характерны для ВС комплексов ионов Fe^{3+} . Значения параметров всех парциальных ГР-спектров указывают октаэдрическое лигандное окружение ионов железа в комплексах. Следовательно, по отношению к ионам железа меланины выступают как лиганды слабого поля.

Значительный интерес представляет выяснение природы структур в комплексе, дающих уширенные магнитные ГР-спектры. Следует отметить, что ГР-спектры, состоящие из парамагнитного дублета и уширенного размытого секстета, могут наблюдаться как в случаях в образце мелких полидисперсных частиц (суперпарамагнетизм), так и в случаях медленной парамагнитной релаксации [5, 6].

Сравнивая параметры ГР-спектров изученных нами осадков со значениями параметров ГР-спектров исходного раствора и известных из литературы параметров ГР-спектров окислов и гидроокислов железа, установлено, что они существенно отличаются [4]. С другой стороны, в наших экспериментах, во избежание гидролиза, для контроля проводили опыты и с добавлением в реакционную среду гидроксилламина ($(\text{NH}_2\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$), сильно препятствующего агента образования окислов или гидроокислов железа. При этом анализ ГР-спектров осадков, полученных с добавлением в реакционную среду гидроксилламина и без него, показал, что формы и параметры парциальных ГР-спектров осадков исключительно идентичны. Для дополнительного исключения возможного образования высокодисперсных окислов или гидроокислов Fe^{3+} , которые также могли бы дать размытый секстетный спектр, была проведена отмывка осадков (комплексов) $^{57}\text{FeSO}_4$ +меланины и полученных в идентичных условиях окислов и гидроокислов Fe^{3+} в растворе H_2SO_4 . Результаты показали, что окислы и гидроокислы Fe^{3+} хорошо растворяются в H_2SO_4 при pH 2,5 в то время, как ионы Fe^{3+} в осадке не отмываются даже при значении pH 1,8. Это дает основание полагать, что исследованные нами осадки не являются механической смесью меланинов с исходным раствором или мелкодисперсными частицами окислов и гидроокислов ионов Fe^{3+} , а являются координационными соединениями ионов железа с исследованными меланинами.

Известно, что растительные меланины являются сложным полимерным образованием, состоящим из мономерных единиц различной структуры. Они содержат орто-гидрохиноидные, орто-хиноидные группы, amino- и имино-группы и карбоксильные группы, каждая из которых может участвовать в связывании ионов железа полимером. Одновременное присутствие магнитной и дублетной компонент в ГР-спектрах, по-видимому, связано с неоднородным распределением железосвязывающих центров в полимере меланина. Для двух или более близко расположенных ионов Fe^{3+} (например, они могут входить в состав полиядерных ($n\geq 2$) кластеров), благодаря быстрой релаксации, обусловленной эффективным спин-спиновым взаимодействием, будут наблюдаться дублетные парциальные ГР-спектра. В случае достаточно разделенных в пространстве ионов Fe^{3+}

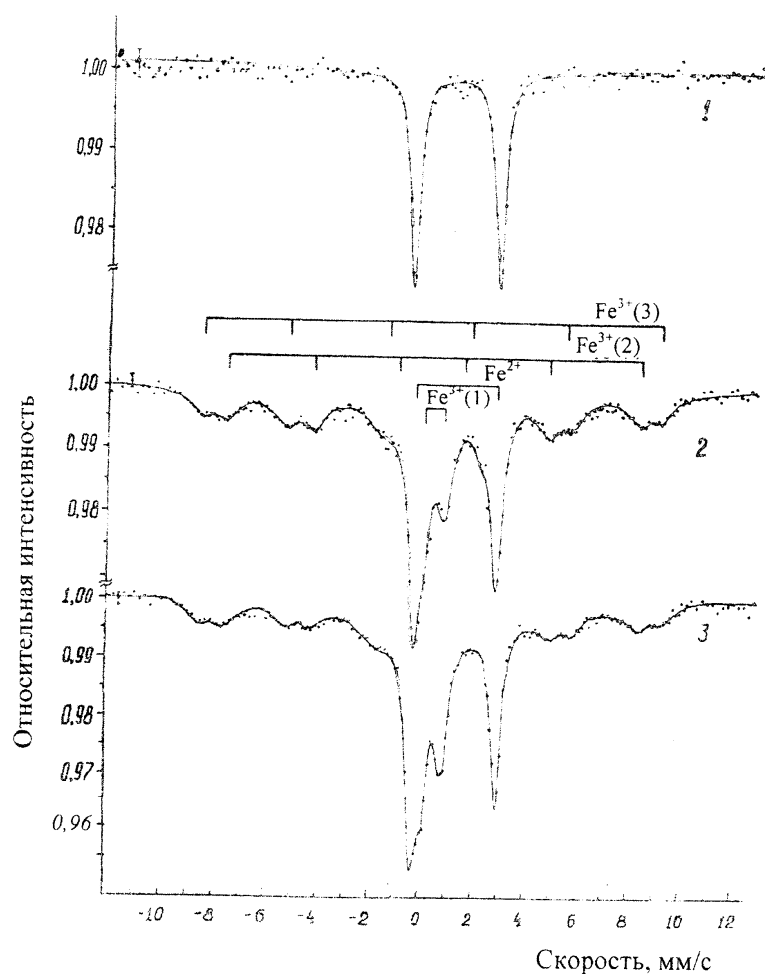


Рисунок 3. ГР-спектры изученных образцов (pH 5,7) при 80 К. 1 – Исходный раствор $^{57}\text{FeSO}_4$; 2 – комплекс $^{57}\text{FeSO}_4+\text{PM1}$; 3 – комплекс $^{57}\text{FeSO}_4+\text{PM2}$

спин-спиновое взаимодействие сильно ослабится, и для таких структур будут наблюдаться релаксационные парциальные ГР-спектры с размытой сверхтонкой структурой [4]. Секстет с полем $\sim 55\text{ Тл}$ ($\text{Fe}^{3+}(3)$) соответствуют ионам Fe^{3+} связанным с карбоксильными группами, секстет с меньшим полем ($\sim 50\text{ Тл}$) соответствует структурам, где в координации Fe^{3+} наряду с COO^- группами участвуют также амино- или имино-группы меланина [6]. Молекулы воды, входящие в состав полимеров, также могут участвовать в координации с ионами железа. Ионы Fe^{2+} образуют с меланинами моноядерные комплексы, при этом центры связывания достаточно удалены друг от друга. Карбоксильная группа при координации с ионами железа могут участвовать как монодентатный так и бидентатный лиганд, для достижения координационной емкости до шести в координации с ионами железа могут участвовать анионы, молекулы воды или другие функциональные группы соседних мономеров полимера меланина. В слабокислых средах в координации с ионами железа могут участвовать также и фенильные группы полимера.

Все вышеперечисленные механизмы связывания ионов железа должны привести к неоднородному распределению ионов железа в объеме полимера меланина, о чем и свидетельствуют результаты ГР-исследования

По своей окисляющей способности Fe^{2+} до Fe^{3+} , а также по способности к связыванию ионов железа PM1 превосходит PM2

Исходя из полученных данных можно полагать, что все эти меланины содержат в своем составе аналогичные функциональные группы по отношению к связыванию ионов железа.

Таким образом, из полученных результатов следует, что растительные меланины способны образовывать комплексы ионами железа как в его двух-, так и трехвалентном состоянии. Существенно, что растительные меланины способны непосредственно связывать ионы Fe^{2+} и окислять их до трехвалентного состояния, неактивного в прооксидантном отношении с последующим связыванием. Активность обоих этих процессов растет по мере увеличения pH реакционной среды.

Таблица 1. Параметры ГР-спектров замороженных растворов изученных образцов при температуре 80 К (А-исходный раствор, В – супернатант после осаждения, С – комплекс (осадок))

№	Образцы	pH	Fe ²⁺		Fe ³⁺ (1)		Fe ³⁺ (2)			Fe ³⁺ (3)			
			ИС, мм/с	КР, мм/с	ИС, мм/с	КР, мм/с	ИС, мм/с	КР, мм/с	В _{эф.} , Тл	ИС, мм/с	КР, мм/с	В _{эф.} , Тл	
57FeSO4+PM1													
1	A	5,4	1,29	3,40	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	B		1,28	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	C		1,35	3,15	0,53	0,84	0,69	0,19	50,0	0,53	0,38	54,9	
4	A	5,7	1,31	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	B		1,33	3,35	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	C		1,32	3,11	0,52	0,85	0,66	0,21	50,1	0,52	0,36	55,0	
7	A	6,0	1,37	3,36	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	B		1,36	3,32	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	C		1,31	3,06	0,51	0,89	0,65	0,22	50,7	0,53	0,35	55,1	
57FeSO4+PM2													
10	A	5,4	1,29	3,40	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	B		1,27	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	C		1,31	3,16	0,52	0,83	0,68	0,20	49,9	0,52	0,34	54,8	
13	A	5,7	1,31	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	B		1,34	3,34	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	C		1,30	3,10	0,50	0,86	0,65	0,22	50,2	0,52	0,31	55,1	
16	A	6,0	1,37	3,36	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	B		1,35	3,31	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	C		1,28	3,05	0,50	0,89	0,63	0,24	50,4	0,51	0,29	55,6	

ИС-изомерный сдвиг, КР – квадрупольное расщепление, В_{эф} – индукция эффективного магнитного поля на ядре

Авторы выражают глубокую признательность руководителю лаборатории «ГР-спектроскопия» отдела «Строение вещества» ИХФ РАН проф. Стукану Р.А. за любезную помощь при выполнении этой работы.

Список литературы / References:

- Грачева Н.В., Желтобрюхов В.Ф. Способ получения меланина из лузги подсолнечника и исследование его антиоксидантной активности. *Вестник Казанского технол. университета*, 2016, т. 19, № 15, с. 154-157. [Gracheva N.V., Zheltobryukhov V.F., Method of producing melanin from sunflower husk and the study of its antioxidant activity. *Vestnik of Kazan Technology University*, 2016, vol. 19, no. 15, pp. 154-157. (In Russ.)]
- Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Дегтярев Е.Н. и др. Сравнительная оценка содержания меланина в составе меланосом и меланолипофусциновых гранул клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека. *Офтальмохирургия*, 2018, № 1, с 78-82. [Sakina N.L., Dontsov A.E., Degtyarev E.N. et al. Comparative evaluation of melanin content in melanosomes and melanolipofuscin granules from the human retinal pigment epithelium cells. *Ophthalmic Surgery*, 2018, no 1, pp. 78-82. (In Russ.)].
- Бушманов А.Ю., Иванов А.А., Андрианова И.Е. и др. Противолучевые свойства меланина. *Саратовский научно-медицинский журнал*, 2014, т. 10, № 4, с. 828-832. [Bushmanov A.Yu., Ivanov A.A., Andrianova I.E. et al. Antiradiation properties of melanin. *Saratov Journal of Medical Csientific Research*, 2014, vol. 10, no. 4, pp. 828-832. (In Russ.)]
- Abbas M., Amico F.D., Morresi L. et al. Strukteral, electrical and optical properties of melanin films. *European Physical Jornal E*, 2009, vol. 28, no. 3, pp. 285-291.
- Фабричный П.Б., Похолок К.В. *Мессбауэровская спектроскопия и её применение для химической диагностики неорганических материалов*. М.: МГУ, 2012, 142 с. [Fabrichniy P.B., Pokholok K.V. *Mossbauer spectroscopy and its application for the chemical diagnosis of inorganic materials*. Moscow: MSU, 2012, 142 p. (In Russ.)].
- Vertes A., Korecz L., Burger K. *Mössbauer spectroscopy*. Budapest: Akad. Kiado, 1979, 432p

THE BINDING OF IRON IONS WITH MELANINS OF PLANT ORIGIN
Bagirov R.M., Bobrova E.Yu., Gafarova H.O., Turabova G.A., Bagirova O.Sh.
Baku State University
Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ1148, Azerbaijan; e-mail: rafiqbagirov@list.ru

Abstract. From the rind of the fruits of the elderberry black and ivy ordinary melanins were isolated. To identify the isolated pigments, their EPR and IR-spectra were recorded. The binding of iron ions with these melanins was investigated by the gamma resonance spectroscopy method (GRS). It has been established that melanins of plant origin effectively chelate iron ions both in its two and trivalent state. When interacting with Fe^{2+} ions, melanins partially oxidize them to Fe^{3+} , which are inactive in a prooxidant ratio, and bind them as well as Fe^{2+} . The parameters of the GR-spectra of the studied samples are characteristic of high-spin (HS) complexes of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions with an octahedral ligand environment. It is assumed that the ability of melanins of plant origin to effectively bind prooxidant Fe^{2+} can be one of the possible mechanisms of their antioxidant and radioprotector properties.

Key words: *melanin, complexation with iron ion, the gamma resonance-spectroscopy.*

THE THRESHOLD VALUE OF THE STATIC MAGNETIC FIELD INDUCTION FOR GTAVITROPIC REACTION DEPENDS ESSENTIALLY ON THE RELATIVE DIRECTION OF STATIC MAGNETIC FIELD AND ROOTS OF PLANTS

Sheykina N.V.¹, Bogatina N.I.,² Linik A.S.²

¹ National University of Pharmacy

Pushkinska st. 53, 61001, Kharkov, Ukraine; e-mail: sheykina@ukr.net

² B. Verkin Institute for Low Temperature Physics & Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine

Nauki ave., 47, 61101, Kharkov, Ukraine; e-mail: n_bogatina@rambler.ru

Received: 24.07.2019

Abstract. It was studied by us earlier the effect of static vertical magnetic field on the gravitropic reaction of cress roots while the horizontal magnetic field was absent. It was revealed here that the dependence of gravitropic reaction on the magnitude of magnetic induction of static magnetic field has the threshold. The value of the threshold magnetic induction was determined. This work is devoted to the investigation of the action of horizontal magnetic field on the gravitropic reaction of cress roots while the vertical magnetic field component is shielded. It was revealed that the gravitropic reaction of cress roots depended essentially on the relative location of roots and static magnetic field. Although in all cases the gravitropic reaction had the threshold character, the magnitude of the threshold essentially differed (by two orders) for different directions of roots relatively the static magnetic field. Two explanations of the effects observed were proposed. The first one was based on the quantitative difference between the interactions of static magnetic field with ions and ions magnetic moments. It was shown that both effects were possible. The difference was caused by ions downstream. It was shown that only during interaction of static magnetic field with ions the anisotropy of the threshold value was possible. The only objection for the model was the fact that free path of ions was too little. The other possible explanation was based on the phase transition in water in the vicinity of the membrane and formation of domains. In that case in the first model we accounted that the ion might rotate in static magnetic field in vacuum zone next to water domain. And the free path of ion increased essentially. This fact neutralized all objections.

Key words: *static magnetic field, roots' gravitropic reaction, the action threshold, relative orientation of roots and magnetic field, phase transitions in water, domains.*

INTRODUCTION

It was revealed before, that effect of combined magnetic field depended essentially on the roots' direction relatively combined magnetic field direction [1-3]. This work is devoted to studying of influence of horizontal static magnetic field on the cress roots gravitropic reaction while the vertical component of magnetic field was shielded. The effect of vertical static magnetic field on the gravitropic reaction of cress roots while the horizontal component of static magnetic field was shielded was studied in [4]. The threshold for vertical magnetic field action was determined in [4].

MATERIALS AND METHODS

The scheme of the set we used is showed on figure 1 [1, 2].

The μ -metal shield with bottom 2 was located on the rubber 1 damping the vibrations of the building. The rings 3 from non-magnetic material centered the solenoid's coils 4 and 5 relatively the central axis of the shield. The coil 5 was used for creating of static magnetic field in solenoid, while the coil 4 was used for creating of alternative magnetic field in solenoid. 6 was the stand from nonmagnetic material, on which the moist chamber 9 with the cress roots was located.

The roots 8 (two days germinated seeds) were located on the stand 7 in the chamber 9. The roots might be located both parallel shield's axis and perpendicular to it. The temperature in the chamber was stabilized with the precision 0.2°. The external appearance was showed on figures 2, 3 [1, 2].

To observe the biological effects caused by static magnetic field it was necessary to provide the homogeneity of magnetic field not less than 1.5%. Such a homogeneity in the construction we used was provided in the cylinder of the diameter 60-70 mm around the cylinder axis and 8-12 mm along it. So the roots length couldn't exceed 8-10 mm for roots located along the axis of the shield.

As we usually used the roots with the length 15-20 mm it was necessary to use some added windings at the ends of solenoid to increase the region of magnetic field's homogeneity.

SCHEME OF EXPERIMENT

The magnetic noises of μ -metal shield located in horizontal plane were measured by means of flux-gate magnetometer and spectra analyzer at the frequency region from 10^{-4} until 100 Hz and by means of induction coil and narrow region amplifier U2-6 at the frequency region 16 Hz – 100 kHz. The coefficient of decreasing of magnetic field was measured too. On the basis of results obtained the electric field noises were counted.

The results obtained were showed on figures 4 and 5.

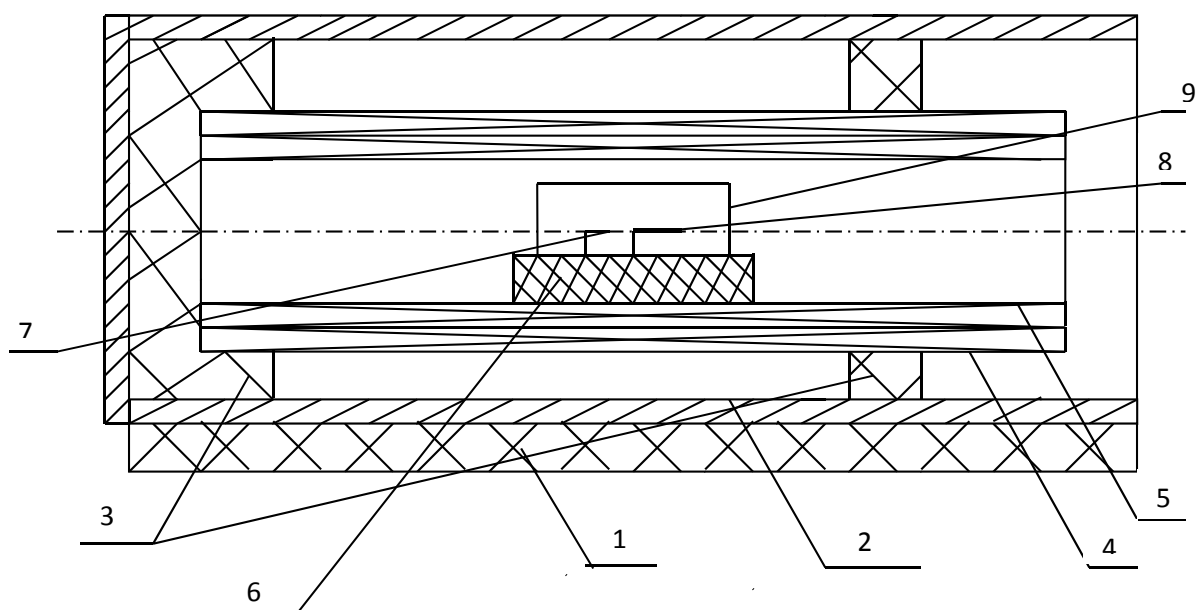


Figure 1. The sight of experimental set in section: 1 – damping rubber; 2 – two layers μ -metal shield with a bottom; 3 – rings made from non-magnetic material, that centralize the solenoids' coils 4 and 5 relatively the central axis of the shield; 4 and 5 – the coils of solenoids; 6 – the stand of non-magnetic material; 7 – the stand of non-magnetic material inside the moist chamber; 8 – roots of cross; 9 – the moist chamber



Figure 2. The external sight of the set from the side



Figure 3. The external sight of the internal part

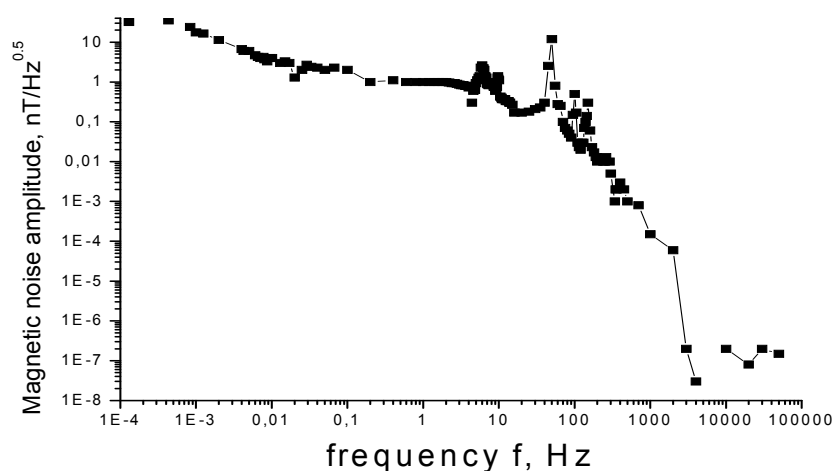


Figure 4. The dependence of amplitude of spectral density of magnetic noise for the system: μ -metal shield + flux gate magnetometer (10^{-4} -100Hz) or μ -metal shield + induction method (16 Hz-100 kHz). Results of different measurements in the region 16-100Hz coincides between themselves very well

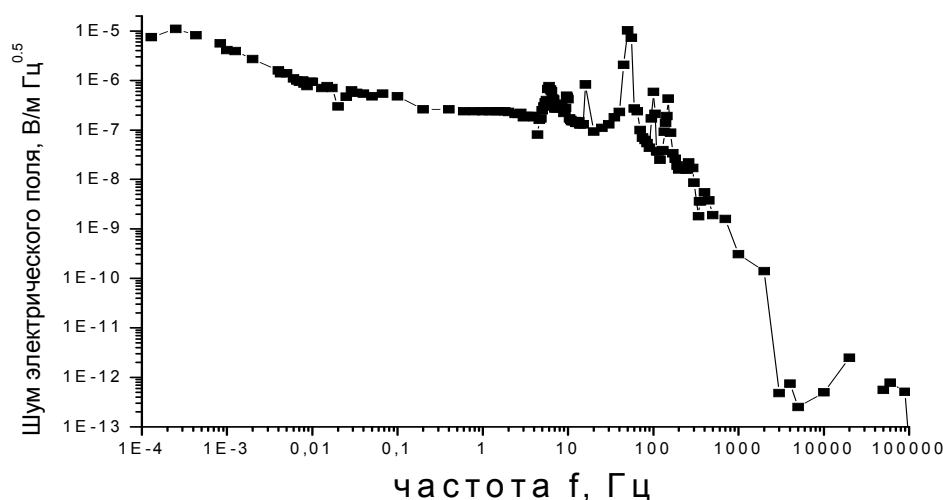


Figure 5. The dependence of amplitude of spectral density of electric field noise for the system: μ -metal shield + flux gate magnetometer

As we can see from the figures there are 3 peaks in the region of frequencies 5-10 Hz (near 5 Hz, 8 Hz, and 9.5 Hz) and 3 well visible peaks at 50, 100 and 150 Hz.

The measurement of spectral noise density was fulfilled by the same way. At first the drift of magnetic field in the shield was measured during the day by means of flux gate magnetometer, connected with the Furies spectra analyzer. The measurements gave us the noise curve at the frequencies from 10^{-4} until 100 Hz. Then by means of induction coil and narrow region amplifier U2-6 we measured the signal at the frequencies from 16 Hz until 100 kHz and the obtained results were divided by the coefficient of shielding of the shield.

Coefficient of shielding was determined by the following way. The shield was located in the big solenoid, in which the rather big magnetic field had been created. The magnetic field was measured without the shield and then inside the shield located in the solenoid. The relation of the external magnetic field to the magnetic field that penetrated inside the shield was the coefficient of shielding. We had to notice here that the magnitude of magnetic noise obtained by these two different methods in the frequency region 16 -100 Hz coincided between themselves very well.

The roots with the length 10-20 mm were located on the stand of nonmagnetic material so that they were parallel to the earth's surface, so perpendicular to the gravity. There were two variants of experiments. In the first one the roots were located parallel to the static magnetic field, in the second one they were located perpendicular to it. The control samples were located both in the «zero» magnetic field and in the magnetic field that was equal to the magnetic field of the Earth.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The results obtained were showed on the figures 6 and 7 for roots direction parallel to magnetic field and perpendicular to gravity vector. Figures 8 and 9 corresponded to the case when the roots direction was perpendicular both to magnetic field and gravity vector.

It was clear from the figures that in the case when the roots were parallel to the horizontal vector of magnetic field the threshold transition was rather steep. It began at 10 μ T and ended approximately at 30 μ T (fig. 6). In the case when the roots were directed perpendicular to the magnetic induction vector the transition was prolonged and seemed to consist from two transitions. The first one began at 4 μ T and ended at 8 μ T, the second one began at 10 μ T and ended approximately at 30 μ T (fig.8). The threshold in vertical magnetic field was located at the values of magnetic induction by two orders lower. It began at the magnetic induction value 0.1 μ T and finished at 1 μ T [4]. Such essential difference for the threshold value of magnetic induction might explain very old results of Yu. I. Novitskiy and M.P. Travkin [5], that was different development of roots systems for different initial orientation of roots north-south or west-east. We could conclude from these results that the main flux of ions that were important for gravitropic reaction was directed along the roots. It was possible that it was the flux of magnetic ions. At first the difference of the threshold values of magnetic field between the ions and magnetic moments was discussed by us in [6]. It was shown there at first the analogies in the magnetic and gravitation fields actions too.

We have to notice here that the kinetic energy of rotating ions was essentially more than the energy of magnetic moments in magnetic field. It was caused by the fact that the ion was rotating along the membrane (the radius of the cell was approximately 5 μ) and the radius of the molecule was lower. The simple estimations gave the following results.

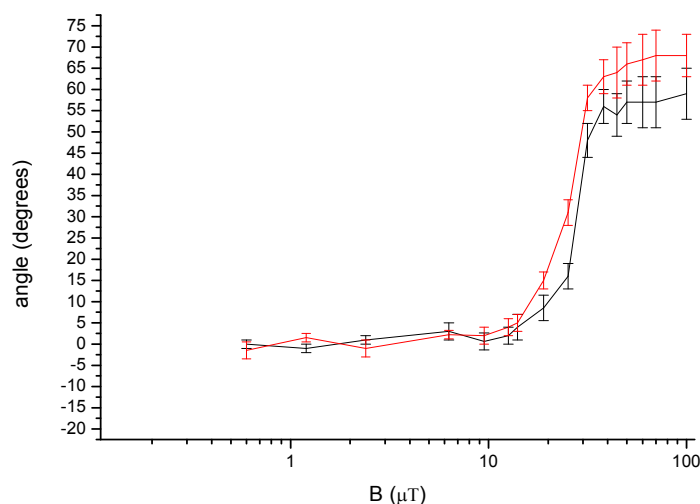


Figure 6. Dependence of the angle of roots divergence from the horizontal plane on the magnitude of static magnetic field. Curve A (black) was for 1 hour treatment in experimental static magnetic field, curve B (red) was for 1.5 hour treatment. The roots were parallel to magnetic induction vector

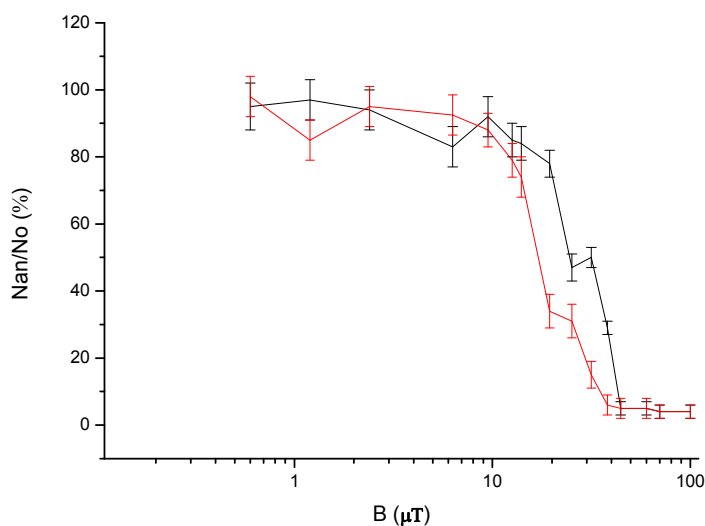


Figure 7. The dependence of % of anomalous roots on the magnitude of static horizontal magnetic field. Curve A (black) was for 1-hour treatment in experimental static magnetic field, curve B (red) was for 1.5-hour treatment. The roots were parallel to magnetic induction vector. The roots were counted anomalous if they didn't diverge from the horizontal plane or if they diverged up

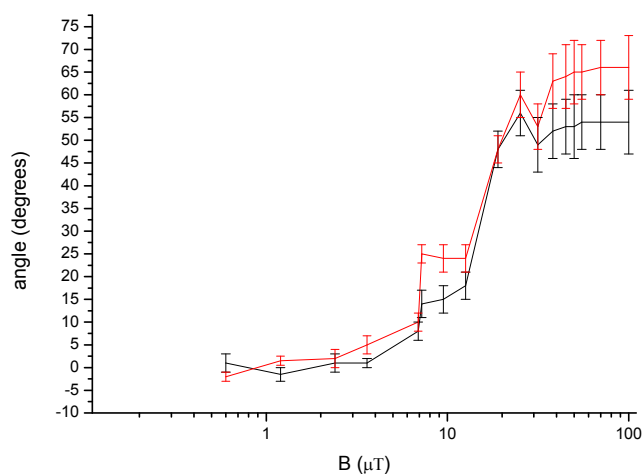


Figure 8. Dependence of the angle of roots divergence from the horizontal plane on the magnitude of static magnetic field. Curve A (black) was for 1-hour treatment in experimental static magnetic field, curve B (red) was for 1.5-hour treatment. The roots were perpendicular to magnetic induction vector

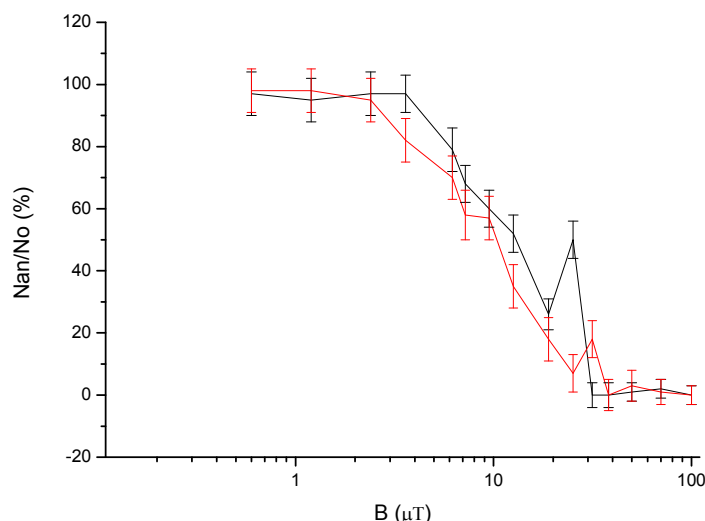


Figure 9. The dependence of % of anomalous roots on the magnitude of static horizontal magnetic field. Curve A (black) was for 1-hour treatment in experimental static magnetic field, curve B (red) was for 1.5-hour treatment. The roots were perpendicular to magnetic induction vector. The roots were counted anomalous if they didn't diverge from the horizontal plane or if they diverged up

The threshold of gravity action on roots was at the level $(10^{-4} - 10^{-3})$ g. The energy of rotating ion in the magnetic field seemed have the same value. [6], the potential energy of ion in gravity was equal

$$U = m \cdot (10^{-4} - 10^{-3}) \cdot g \cdot a. \quad (1)$$

Here m was mass of ion, for instance for calcium ion, a was the dimension of plant cell that was approximately $10 \mu\text{m}$, g was the acceleration of free fall on the Earth. The submitting of quantities in (1) gave the value $U = (10^{-32} - 10^{-33}) \text{J}$.

The energy of magnetic moment in the magnetic field with the magnetic induction B was equal

$$U = m \cdot B. \quad (2)$$

Here M was magnetic moment for calcium ion, it was of the order 10^{-28}J m/Vib . So for the threshold B we obtained the value $10 - 100 \mu\text{T}$.

Analogically the energy of the rotating ion in the magnetic field was counted. It was equal

$$U = m\omega^2 a^2 / 2. \quad (3)$$

And taking in account that

$$\omega = qB/m. \quad (4)$$

Here q was the ion charge; ω was its cyclotron frequency in the magnetic field. So for the threshold B we obtained the value $0.1 - 1 \mu\text{T}$.

So it was shown that in gravitropic reaction in the magnetic field took part both ions and magnetic moments of these ions. While the moving of ions had the determined direction the difference in the threshold values of magnetic induction for different roots direction might be very big until 2 orders. The effect was observed in this work. Besides for some directions of magnetic field a few thresholds could be observed. We saw the effect in vertical magnetic field [4] and in this work. It was necessary to take into account that in the gravitropic reaction could take part different ions with different magnetic moments. That might to cause the complicated form of the threshold curve.

The other explanation of the presence of the threshold in the action of static magnetic field is based on the new works about the phase transition in the water [10-15]. In static magnetic field the ions may rotate around the water domains in the vacuum region between domains, that is of the order 10 nm and they don't leave the region. So they don't take a part in the chemical processes. That leads to the changes in gravitropic reaction. The process begins from the field that corresponds the most little radius of cluster and finishes at the most big one. The domains can have non spherical form and their smallest and biggest radiuses in different directions may differ. We have to notice here that in our experiment even remained magnetic field at the frequency 50 Hz in the 3-layered μ -metal shield (at the level $20 - 50 \text{ nT}$) is enough to generate phase transitions in water. In our experiments only in superconducting shield it may be decreased by 1000 times. But in superconducting shield we cannot create horizontal magnetic field because of lack of dimensions in horizontal direction.

CONCLUSIONS

1. The different threshold values of magnetic induction for gravitropic reaction creation was observed experimentally for different relative direction of roots, horizontal vector of magnetic induction and gravity vector.
2. The effects observed were compared with the results obtained for vertical magnetic field threshold value.
3. Two explanations of difference between the threshold values of magnetic induction in different directions was proposed. The first one was connected with the determined direction of ion's flux in the vertical magnetic field and action on ions. In the horizontal magnetic field the threshold value was determined by the action on the magnetic ions. The second one was connected with the phase transition in whater

References:

1. Bogatina N.I., Shejkina N.V., Kordjum E.L. Vlijanie orientacii kornej kress-salata i kukuruzy odnositel'no kombinirovannogo magnitnogo polja na izmenenie ih gravitropicheskoy reakcii. Jeksperiment i novaja gipoteza, mehanizm adaptacii. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Serija «Biologija, himija»*, 2012, vol. 25 (64), no. 2, pp. 16-30. (In Russ.)
2. Bogatina N.I., Shejkina N.V., Kordjum E.L. Maize and cress roots orientation in combined magnetic field change roots gravitropic reaction response on its action. Experiment and new hypothesis . Adaptation mechanism. *Proceedings of VI International Congress "Low and superlow magnetic fields and radiation in biology and medicine*, 02-06 July 2012, Saint-Petersburg, pp. 73-82, ISBN 5-86456-007-3.
3. Bogatina N.I., Shejkina N.V. Influence of different relative orientation of static and alternative magnetic fields and cress roots on their gravitropic reaction. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Serija «Biologija, himija»*, 2014, vol. 27, no. 1, pp. 24-28, ISSN 1606-3716.
4. Bogatina N.I., Shejkina N.V., Kordjum E.L. Izmenenija gravitropicheskoy reakcii, vyzvannye postojannym magnitnym polem. *Biofizichnij visnik*, 2006, no. 17 (1), pp. 78-82. (In Russ.)
5. Travkin M.P., Novickij Yu.I. On the question of the orientation of roots in the geomagnetic pole. *Materialy nauchno-metodicheskoy konferencii, Himiya. Biologiya. Zoologiya*. Belgorod, Belgorod Pedagogical Institute, 1970, pp. 73-76. (In Russ.)
6. Bogatina N.I., Litvin V.M., Travkin M.P. Possible mechanisms of action of magnetic, gravitropic and electric fields on biological objects, the analogies in their action. *Electronic treatment of materials*, 1986, no. 1, pp. 64-67.
7. Bogatina N.I., Verkin B.I., Kulabuhov V.N., Litvin V.M, Nikulina V.F. Opredelenie poroga chuvstvitel'nosti prorostkov i kornej pshenicy k velichine magnitnogo polja. *Fiziologija rastenij*, 1979, vol. 26, no. 3, pp. 620-625. (In Russ.)
8. Merkis A.I. Geotropic reaction of plants. Vil'nyus, 1973. (In Russ.)
9. Bogatina N.I., Shejkina N.V. Vlijanie peremennogo magnitnogo polja na gravitropicheskuyu reakciju rastenij pri jekranirovanii postojannoju sostavljajushhej magnitnogo polja. Rol' chastot Shumana. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo Serija «Biologija, himija»*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 27-34, ISSN 1606-3716. (In Russ.)
10. Bogatina N.I., Sheykina N.V. Role of hydronium ions in biological effects of weak combined magnetic fields. *J. Physics of alife*, 2014, vol. 21, no. 1-2, pp. 43-45.
11. D'Emilia E., Giuliani L., Lisi A., Liboff A.R. Lorentz force in water: Evidence that hydronium cyclotron resonance enhances polymorphism. *J. Electromagnetic Biology Medicine*, 2014, vol. 34, pp. 370-375.
12. Grimaldi S., Lisi A., Ledda M., D'Emilia E., Liboff A.R., Giuliani L., Foletti A. Weak-field H₃O(+) ion cyclotron resonance alters water refractive index. *J. Electromagnetic Biology and Medicine*, 2016, vol. 36, pp. 1-24.
13. Sheykina N.V. The Role of the Water and its Complexes in the Biological Effect Created by Weak Combined Magnetic Field. *Proceedings of 9th international Kharkiv symposium on physics and engineering of microwaves, millimeter and submillimeter waves MSMW'2016*, Kharkiv, 20-24 June 2016 (A-37). ISBN:9781509022663. Kharkiv : VNLU.
14. Del Giudice E., Fleischmann H., Preparata G., Talpo G. On the "unreasonable" effects on ELF magnetic fields upon a system of ions. *J. Bioelectromagnetics*, 2002, vol. 23, pp. 522-553.
15. Sheykina N.V., Bogatina N.I. Primary physical mechanism of different magnetic fields action on biological objects. *J. Biophysical Bulletin*, 2017, vol. 38, no. 2, pp. 35-44.

INFLUENCE OF PHASE TRANSITION OF NEAR MEMBRANE WATER ON GRAVITROPIC REACTION OF PLANTS IN DIFFERENT COMBINATION OF MAGNETIC AND ELECTRIC FIELDS

Bogatina N.I.¹, Sheykina N.V.², Linnik A.S.¹

¹ B. Verkin Institute for Low Temperature Physics & Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine
Nauki ave., 47, 61101, Kharkov, Ukraine; e-mail: n_bogatina@rambler.ru

² National University of Pharmacy
Pushkinska st. 53, 61001, Kharkov, Ukraine; e-mail: sheykina@ukr.net

Received: 24.07.2019

Abstract. It was shown before that the effect of the combined magnetic field on the gravitropic reaction of plants' roots depended essentially on the initial orientation of roots and combined magnetic field and gravity vectors. Goal of the work fulfilled under the conditions of low level of magnetic and electric fields' noises, was, to summary the experimental results obtained in this and our previous works and to understand the common mechanism of these differences. So the experiments of simultaneous action of static magnetic field and alternating electric field of different orientations relatively each other were observed. The gravitropic reaction of cress roots was investigated in static vertical magnetic field and alternating electric field of all possible different directions relatively the magnetic field and roots direction (3 variants). The alternating electric field was tuned to cyclotron frequency of Ca^{2+} ions in vertical magnetic field. The biological effect wasn't observed at all for the roots parallel to static magnetic field. The analogous investigation has been fulfilled for horizontal magnetic field. The alternating electric field was tuned to cyclotron frequency of Ca^{2+} ions in horizontal magnetic field. Six different types of relative directions of magnetic field, electric field and roots were investigated. The clear biological effect was obtained only for two cases from six, when the roots were not parallel to the magnetic field. The direction of roots relatively both static magnetic field and alternating electric field is very important. The effect may be explained by membrane breathing caused by alternating electric field because the alternating electric field created the alternating magnetic field. But other explanation is the phase transition in near membrane water and it is more likely. The effect caused by the rotation of ions around the domains in the vacuum layer. This explanation explained very well the results obtained both in combined magnetic field and in the static magnetic field combined with the alternating electric field.

Key words: static magnetic field, alternating electric field, gravitropic reaction, roots' direction, ion's cyclotron frequency, phase transition in water.

INTRODUCTION

The investigation of combined magnetic field (CMF, static and parallel to it alternating magnetic field) influence on the plants roots gravitropic reaction have been studied in details before for different relative orientation of fields and roots initial direction [1-4]. It was shown that the biological effect depended essentially on the orientation of roots relatively the CMF [3]. It was shown also that the roots initial direction relatively B_{DC} and B_{AC} (B_{DC} and B_{AC} were inductances of static and alternating magnetic fields when they were not parallel to each other) were essential for the observation of negative gravitropic reaction presence and decreasing of gravitropic reaction [4]. The effect we obtained might be explained by our theory based on Liboff's hypothesis (the electric field of membrane was taken in consideration [5]) and ours previous work [3, 4]. It was shown in [3, 4] that the breathing of the membrane caused by the changes of ions pressure on it was important only in the cases when the ions' direction of moving was not parallel either for B_{DC} or B_{AC} .

To confirm or deny our hypothesis we changed the alternating component of magnetic field by alternating electric field of different orientations. пааее

The first part of the work was devoted to the experiments in vertical static magnetic field.

EXPERIMENTS IN VERTICAL STATIC MAGNETIC FIELD

- At first experiment the static magnetic field was directed parallel to the gravity vector, the alternating electric field was directed parallel to static magnetic field, roots were directed perpendicular to both two fields components and gravity vector.
- At second experiment the static magnetic field was directed parallel to the gravity vector, the alternating electric field was directed perpendicular to static magnetic one, roots were directed parallel to alternating electric field.
- At third experiment the static magnetic field was directed parallel to the gravity vector, the alternating electric field was directed perpendicular to static magnetic one, roots were directed perpendicular to both two field's components and gravity vector.

Materials and methods.

For the investigation a new initial part of the setting we used before was made. The previous setting of the investigation was described in details before [2, 3]. The only distinction was the possibility to obtain the electric field that was parallel or perpendicular to gravity vector. For the purpose the samples were located in capacitance between two non-magnetic planes (fig. 1, 2).

The only difference between figure 1 and figure 2 was the orientation of the electric field created by non-magnetic planes.

To decrease both the noise of the shield, and generated by solenoid we used the superconducting shield with warm volume inside. The inside part of the warm volume coincides with the inside part of μ -metal shield represented on figures 1 and 2. The magnetic and electric noise 1/f and Nyquist one were decreased by 100-1000 times. But the vibration noise and 50 Hz noise level decreased only by 20 – 100 times. The Shuman noise at 8 Hz was almost at the same level. So the level of Nyquist noise was at the order of 0.02 nT, at 50 Hz of the order 1-0.2 nT and at 8 Hz it was at the order of 1-2 nT. But we can decrease the magnetic noise of the generator of electric field only down to 5-10 nT.

Results.

The results were obtained for the configuration of fields that were shown on figure 4 just as in [6]. As it is clear from figures 5 and 6 the gravitropic reaction velocity depended essentially on the direction of initial roots growing relatively the alternating electric field direction. It was revealed at the first and second experiments that the velocity of gravitropic reaction was decreased essentially while at the third experiment it didn't differ from the control experiment. We observed the biological effect only for the experiments when the amplitude of alternating electric field was 100 V/m and more. Any effect was observed at the amplitude of alternating electric field 10 V/m. We have to notice here that it is impossible to determine the exact value of amplitude of alternating electric field because of the wet environment of roots. The exact value depends on the humidity of the camera and the electric resistance of the root.

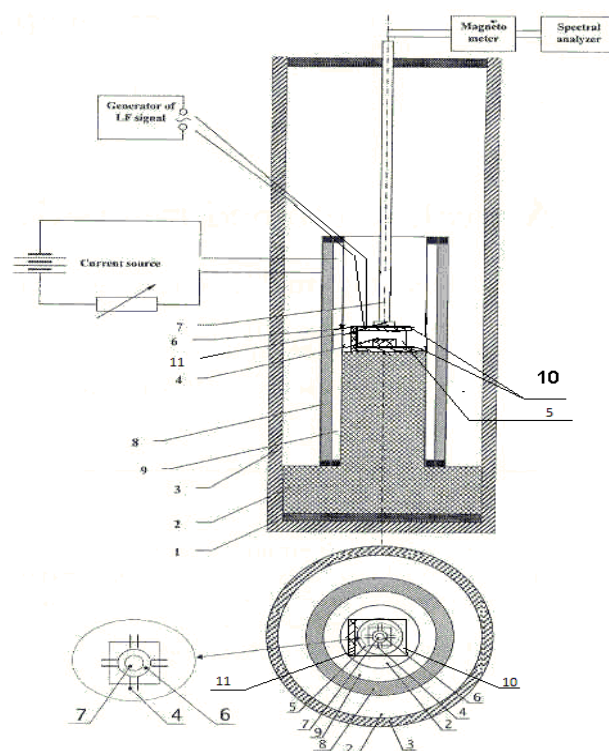


Figure 1. The damping rubber (1) supported the holder of dielectric material (2). The μ -metal shield (3) surrounded the samples (4) that were mounted inside a moist chamber of non-magnetic plastic material (5) and solenoids (8, 9). The magnetic field was measured and controlled by sensor elements (fluxgate magnetometer or SQUID) (6) inside a holder (7). The solenoids (8, 9) had a cylindrical shape and comprised the system that generated the static magnetic field (9) [2, 3]. The new part: two flat plates from non-magnetic material (10) were sourced from LF generator. They were divided by dielectric plate (11). The enlarged central part of the top view showed the orientation of 4 pairs of roots (4), arranged around the magnetic field sensor (7). The coils of solenoids (8, 9) were the spaces between the circles in the bottom part. The space between the innermost circles was the holder of dielectric material (2)

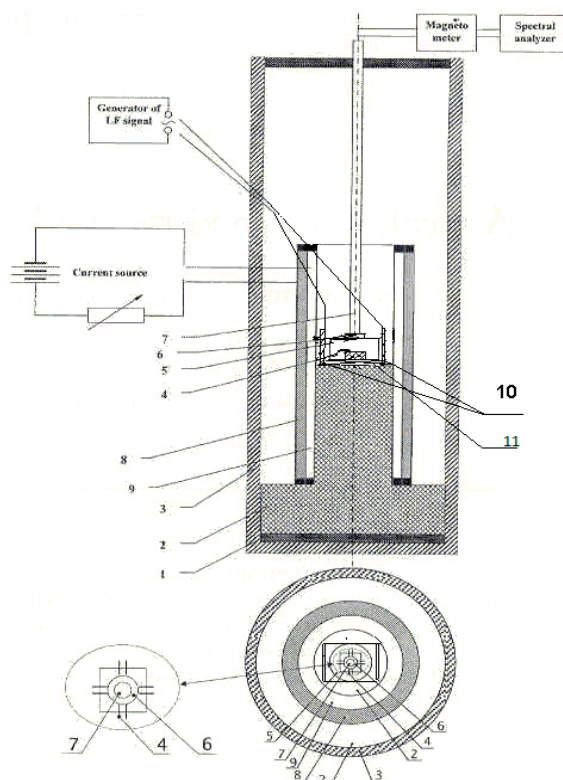


Figure 2. The damping rubber (1) supported the holder of dielectric material (2). The μ -metal shield (3) surrounded the samples (4) that were mounted inside a moist chamber of non-magnetic plastic material (5) and solenoids (8, 9). The magnetic field was measured and controlled by sensor elements (fluxgate magnetometer or SQUID) (6) inside a holder (7). The solenoids (8, 9) had a cylindrical shape and comprised the system that generated the static magnetic field (9) [2, 3]. The new part: two flat plates from non-magnetic material (10) were sourced from LF generator. They were divided by dielectric plate (11). The enlarged central part of the top view shown the orientation of 4 pairs of roots (4), arranged around the magnetic field sensor (7). The coils of solenoids (8, 9) were the spaces between the circles in the bottom part. The space between the innermost circles was the holder of dielectric material (2)

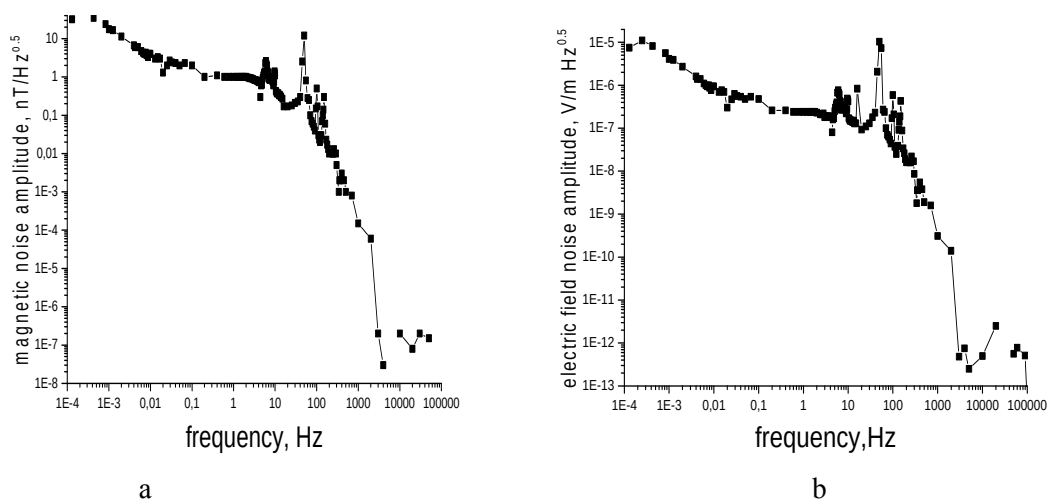


Figure 3. The amplitudes of spectral densities of magnetic (a) and electric (b) fields' noises' dependencies on frequency (μ -metal shield)

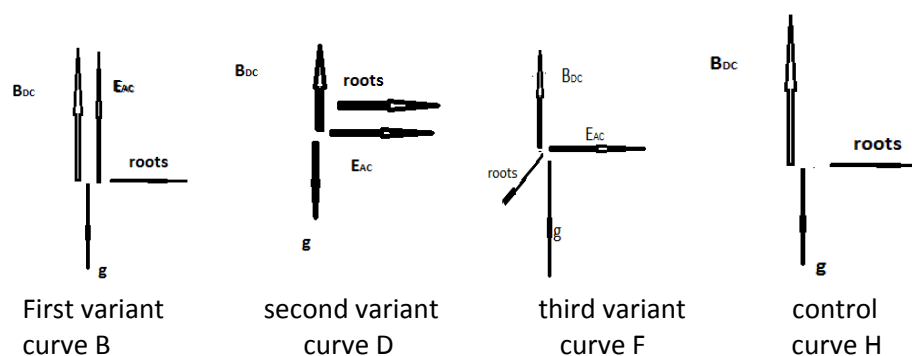


Figure 4. The value of static magnetic field induction was equal to $8.65 \mu\text{T}$, the frequency of alternate electric field was equal to 6.85 Hz , and the amplitude of electric field was equal to 100 V/m . Curves B, D, F and H correspond to the figure 5

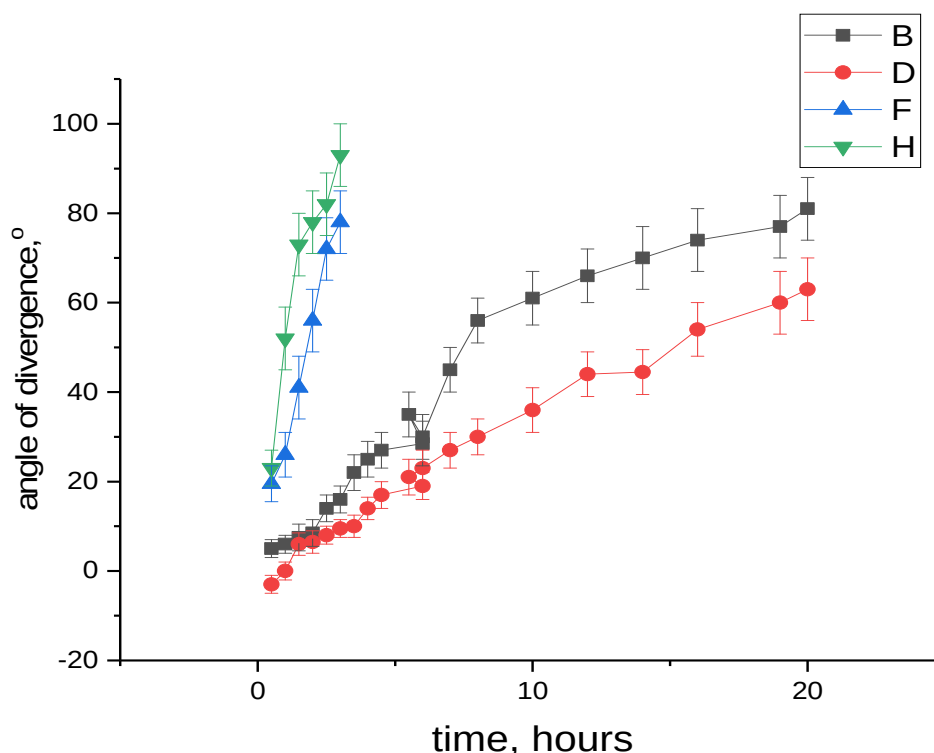


Figure 5. The dependences of divergences of cress roots from the horizontal plane on time. Curve B corresponds to the first experiment (fig.4) curve D corresponds to the second experiment (fig.4), curve F relates to the third experiment (fig. 4) and curve H relates to the control experiment. The value of static magnetic field induction is equal to $8.65 \mu\text{T}$, the frequency of alternating electric field is equal to 6.85 Hz , and the amplitude of electric field is equal to 100 V/m

EXPERIMENTS IN HORIZONTAL STATIC MAGNETIC FIELD

The following experiments of roots location relatively the static horizontal magnetic field and alternating electric field were investigated. In all variants the static magnetic field with magnetic inductance B_{DC} was directed perpendicular to the gravity vector g .

In the first experiment the electric field was directed parallel to magnetic one and the roots were perpendicular to both of them.

In the 2-nd experiment the electric field was directed perpendicular to the magnetic one and parallel to the gravity vector g , the roots were perpendicular to both fields.

In the 3-d experiment the electric field was directed perpendicular to magnetic one and parallel to g , the roots were parallel to magnetic field.

In the 4-th experiment the electric field was directed parallel to magnetic one and roots were parallel to both of them.

In the 5-th experiment the electric field was directed perpendicular to both the magnetic field and g and the roots were parallel to magnetic field.

In the 6-th experiment the electric field was directed perpendicular to both the magnetic field and g and the roots were parallel to electric field B_{DC} .

New experimental setting.

To obtain the horizontal magnetic field it was necessary to turn the settings that had been drawn on figures 1 and 2 on the side by the same way as in the work [3]. Then the axes of the shield and the solenoid became horizontal. In that case the setting shown on fig. 1 created horizontal electric field and the setting shown on fig. 2 created vertical electric field. The direction of artificially created magnetic field was horizontal. The dependences of amplitude spectral density of magnetic field and electric fields noises on the frequency were similar to the dependencies shown on figure 3. But the amplitudes of spectral densities of magnetic and electric field's noises were approximately by seven times less. We have to notice here that we oriented the μ -metal shield perpendicular to the direction of horizontal component of Earth's magnetic field. It allowed us to decrease the magnetic and electric noises essentially (by the order of 50 times)..

Results.

The results obtained were shown on figures 7 and 8.

It was clear from figures 5 and 7 that the main condition under which the gravitropic reaction inhibition was observed was the following. The roots needn't be parallel to the static magnetic field and had to be parallel to the alternating electric field.

DISCUSSION

The results obtained in this work confirm the results of our previous works [3, 4]. It was shown in the works [3, 4] that the biological effect on gravitropic reaction existed only in the cases when the roots direction was perpendicular to static or alternating magnetic fields or to both of them. In this work we showed that the same effect existed. The gravitropic reaction was sensitive to simultaneous action of static magnetic field and alternating electric one only when the roots direction didn't coincide neither with the direction to static magnetic field nor with the direction of alternating magnetic field created by alternating electric field. This result coincides well with the results of previous works [3-5] and confirmed the fact that the main direction of Ca^{2+} ions' moving was the moving along the roots. The results obtained in horizontal magnetic field confirmed the results obtained in vertical magnetic field.

The effect we obtained might be explained by our theory based on Liboff's hypothesis [5], that (the electric field of membrane had to be taken in consideration) as ours previous works. The alternating electric field created alternating pressure on membrane in the direction of the electric field and so the membrane began to breathe with the same frequency. The membrane breathing was important only in the cases when the ions direction of moving was not parallel either for B_{DC} or B_{AC} . Here B_{AC} is the alternating magnetic field created by alternating electric field.

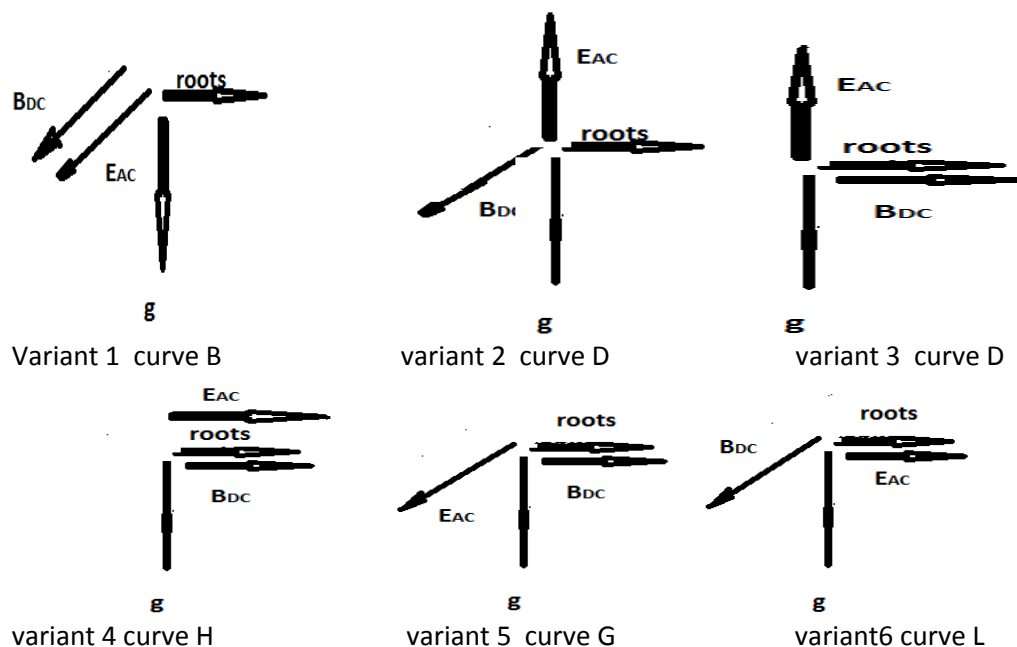


Figure 6. Variants of experiments in horizontal static magnetic field combined with the alternative electric fields of different directions. In the down part of the scheme the curves corresponding to every variant was signed in the correlation with the figure 8

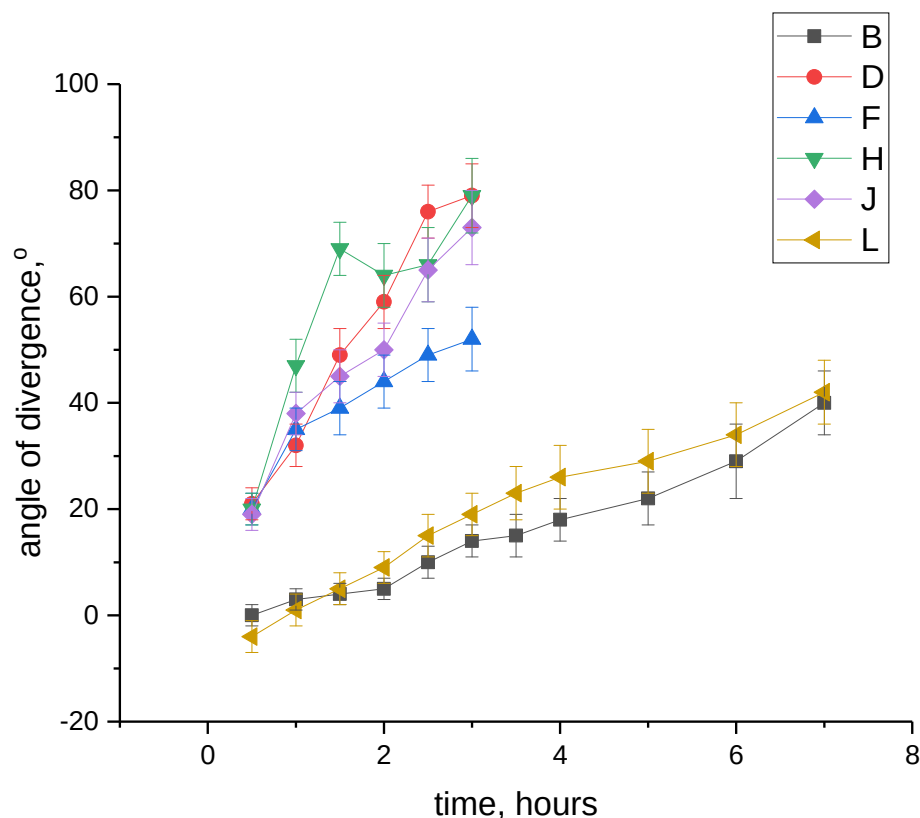


Figure 7. Dependence of cress roots angle of divergence from the horizontal place on time. Magnetic field was directed perpendicular to gravitational vector $\mathbf{g}$. Curve B corresponded to the first experiment (the electric field was parallel to magnetic one and the roots were perpendicular to both of them); curve D corresponded to the second experiment (the electric field was perpendicular to the magnetic one and parallel to the gravity vector $\mathbf{g}$, the roots were perpendicular to both fields); curve F corresponded to the third experiment the electric field was perpendicular to magnetic one and parallel to $\mathbf{g}$, the roots were parallel to magnetic field); curve H corresponded to the forth experiment (the electric field was parallel to magnetic one and roots were parallel to both of them); curve J related to the fifth experiment (the electric field was perpendicular to both the magnetic field and $\mathbf{g}$ and the roots were parallel to magnetic field); curve L related to the sixth experiment (the electric field was perpendicular to both the magnetic field and $\mathbf{g}$ and the roots were parallel to electric field). The value of static magnetic field induction was equal to $8.65 \mu\text{T}$, the frequency of alternating electric field was equal to 6.85 Hz , and the amplitude of electric field was equal to 100 V/m .

We tried to estimate the amplitude of electric field necessary to observe the effect. The Maxwell equation is:

$$\text{Rot}E = -dB/dt. \quad (1)$$

So for the cell:

$$E2\pi a = 2\pi f B_{AC}. \quad (2)$$

Here E – the electric field value; f – the frequency of alternating electric field component. For plant cell with the a of the order of $10 \mu\text{m}$, $f = 31.75 \text{ Hz}$ and $B_{AC} = 40\text{--}70 \mu\text{T}$ we obtain for E_{AC} value of the order $100\text{--}200 \text{ V/m}$. This value coincided very well with the value of acting E_{AC} in our experiment.

The more convincing conclusions that may be made from the experiments that are shown in this work are based on the last works of Liboff, Foletti and Marchettini [8–10]. All these works were devoted to the phase transition in the pure water in combined magnetic field [8], the presence of structured domains in the water and higher conductivity in the domains caused by the proton hopping between the domains [9], and the presence of the ‘vacuum’ region between the domains [10]. In our previous work [11] to explain the cyclotron resonance existence we regarded the rotation along the cell from the inner part of the cell. The only counterargument for existence of ion cyclotron resonance in that case was the small free path of ion at room temperature. In the case of domains the protons rotate around the domain in the vacuum layer of the order 10 nm . So there no obstacles for the ion cyclotron resonance existence.

The possibility of phase transition in water *in vivo* during the treatment at cyclotron frequency of H_3O^+ was proved [12, 13]. Besides we have to underline here that we must to take into account the generation of magnetic noise in wet seeds [14, 15]. The fact was confirmed by the last work of Liboff [16] and the values of generated noise level observed in [14–16] coincide between themselves. More over according to [8, 9, 14] it may be caused by the external magnetic field

noise. The external magnetic noise with the noise level 5-20 nT may create the magnetic noise in wet seeds up to 80 nT while the dry seeds don't change the noise level of the shield used [14]. All these facts prove the leading role of water in all biological processes.

Now we can investigate the substitution of alternating magnetic field by alternating electric field. In all cases when the roots are directed along the static magnetic field there was no biological effect (or it was very small and existed only at the beginning of the treatment). This fact showed that the Ca^{2+} ions moved in the direction that was parallel to the direction of static magnetic field.

Vertical static magnetic field.

In the case when the direction of alternating electric field coincided with the direction of root and so with the direction of Ca^{2+} ions moving the effect was maximal and we observed even the negative gravitropic reaction. This case was similar to the effect we had observed before in combined magnetic fields when both its components had been directed parallel to each other and gravitation vector. The alternating electric field modulated ions velocity's magnitude absolutely analogous the modulation of magnetic induction modulation (fig. 4, second variant).

The first variant in fig.4 corresponded to variant, when the alternating electric field was perpendicular to roots and static magnetic field. The experiment showed the essential inhibition of gravitropic reaction. In this variant the Ca^{2+} ions moved by the spiral. Its observation was limited by the dimension of the domain.

Horizontal static magnetic field.

The first variant in figure corresponded to the first variant of figure 4 and the sixth variant corresponded to the second variant of figure 4. The second variant in figure 6 corresponded to exit from domain region.

All other variants in figure 6 corresponded to the third variant of figure 4.

We have to notice here that in our experiment even remained magnetic field at the frequency 50 Hz in the 3-layered μ -metal shield (at the level 20-50 nT) is enough to generate phase transitions in water. In our experiments only in superconducting shield it may be decreased by 1000 times. But in superconducting shield we cannot create horizontal magnetic field because of lack of dimensions in horizontal direction.

We have to notice here that while the gravitropic reaction is absent, the roots become thicker. The effect may be connected with water detained in roots.

CONCLUSIONS

The direction of roots relatively both static magnetic field and alternating electric field is very important.

The effect may be explained by membrane breathing caused by alternating electric field. The alternating electric field created the alternating magnetic field. The results obtained in combined magnetic field coincided very well with the results obtained in magnetic field acting simultaneously with electric field.

The other explanation is the phase transition in near membrane water. The effect caused by the rotation of ions around the domains in the vacuum layer. This explanation explained very well the results obtained both in combined magnetic field and in the static magnetic field combined with the alternating electric field.

All results confirmed the directed moving of ions Ca^{2+} in the roots and the fact that all effects were connected with the ions moving.

The role of water is very important too. The existence of ion cyclotron resonance may be explained by phase transition in water. More other phase transition in water may be created by magnetic noise of the system.

References:

1. Kordyum E.L., Bogatina N.I., Kalinina Ya. M., Sheykina N.V. A weak combined magnetic field changes root gravitropism. *Advances in Space Research*, 2005, vol. 36, no. 7, pp. 1229-1236.
2. Kordyum E.L., Bogatina N.I., Sobol M.A., Kalinina Ja.M., Kondrachuk A.V. Cyclotron-based effects on plant gravitropism. *Advances in Space Research*, 2007, vol. 39, p. 1210.
3. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V., Kordyum, E.L. Maize and cress roots orientation in combined magnetic field change roots gravitropic reaction response on its action. Experiment and new hypothesis. Adaptation mechanism. *Proceedings of VI International Congress "Low and superlow magnetic fields and radiation in biology and medicine"*, Saint-Petersburg, 02-06 July 2012, pp. 73-82. ISBN 5-86456-007-3. Saint-Petersburg: VNU.
4. Bogatina N.I., Sheykina N.V. Influence of different relative orientation of static and alternative magnetic fields and cress roots on their gravitropic reaction. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo Seriya «Biologiya, himiya»*, 2014, vol. 27, no. 1, pp. 24-28.
5. Vincze L., Szasz G., Liboff A. New theoretical treatment of ion resonance phenomena. *Bioelectromagnetics*, 2006, vol. 29, pp. 380-386.
6. Bogatina N.I., Sheykina N.V., Linnik A.S. Effect of alternating electric fields of different directions on the cress roots' gravitropic reaction in vertical static magnetic field. *Scientific Notes of Crimean V. I. Vernadsky Federal University Series «Biology, chemistry»*, 2015, vol. 1, no. 1, pp. 3-9.
7. Sheykina N.V. Influence of alternating electric fields of different directions on the cress roots' gravitropic reactions in horizontal static magnetic field. *Scientific Notes of V.I. Vernadsky Crimean Federal University Series «Biology, chemistry»*, 2015, vol. 1, no. 3, pp. 81-87.
8. Grimaldi S., Lisi A., Ledda M., D'Emilia E., Liboff A.R., Giuliani L., Foletti A. Weak-field $\text{H}_3\text{O}^{(+)}$ ion cyclotron resonance alters water refractive index. *J. Electromagnetic Biology and Medicine*, 2016, (001R.2), pp. 1-24.

9. Foletti A., Grimaldi S., Lisi A., Ledda M., Liboff A.R. Bioelectromagnetic medicine: The role of resonance signaling. *J. Electromagnetic Biology and Medicine*, 2013, vol. 32, no. 4, pp. 484-499.
10. Marchettini N.I., Del Giudice E., Voeikov V., Tiezzi E. Water: A medium where dissipative structure is produced by a coherent dynamics. *J. Theor Biol.*, 2010, vol. 265, no. 4, pp. 511-516.
11. Sheykina N.V., Bogatina N.I. Primary physical mechanism of different magnetic fields action on biological objects. *J. Biophysical Bulletin*, 2017, vol. 38, no. 2, pp. 35-44.
12. Bogatina N.I., Sheykina N.V. Role of Hydronium ions in biological effects of weak combined magnetic fields. *J. Physics of Alive*, 2014, vol. 21, no. 1-2, pp. 43-45.
13. Sheykina N.V. The Role of the Water and its Complexes in the Biological Effect Created by Weak Combined Magnetic Field. *Proceedings of 9th international Kharkiv symposium on physics and engineering of microwaves, millimeter and submillimeter waves MSMW'2016*, Kharkiv, 20 – 24 June 2016 (A-37). ISBN:9781509022663. Kharkiv: VNLU.
14. Bogatina N.I., Sheykina N.V. Sobstvennoe magnitnoe pole zernovok pshenitsyi i generiruemyye imi magnitnyie shumyi. *J. Biophysical Bulletin*, 2001, vol. 8, no. 1, pp. 101-107.
15. Sheykina N.V., Bondarenko V.A., Bogatina N.I. Vliyanie vneshnih iagnitnyih шумов na gravitropicheskuyu reaktsiyu rasteniy i amplitudu i spektr generiruemogo imi v protsesse rosta magnitnogo shuma. *J. Biophysical Bulletin*, 2008, vol. 20, no. 1, pp. 96-102.
16. D'Emilia E., Giuliani L., Lisi A., Ledda M., Grimaldi S., Montangnier L., Liboff A.R. Lorentz force in water. Evidence that hydronium cyclotron resonance enhances polymorphism. *J. Electromagnetic Biology and Medicine*, 2015, vol. 34, pp. 370- 375.

ВЛИЯНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ СИНАПТИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ NMDA НА ОСЦИЛЛЯЦИИ В НЕЙРОННЫХ СЕТЯХ

Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований

ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: dushanov@jinr.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. В работе было проведено молекулярно-динамическое моделирование активации ионного канала мутантных форм NMDA-рецептора. Анализировались би и тримерные формы рецептора с различной композицией субъединиц. Проводимость ионного канала вычислялась по данным пакета HOLE, а также анализа связывания ионов магния. Анализ полученных структур позволил определить изменение проводимостей ионного канала, которые сильно уменьшались в случае двойных точковых мутаций и делеций. Полученные данные использовались в модели нейронной сети гиппокампа в пакете NEURON. В результате удалось исследовать влияние мутаций, кодирующих белковые субъединицы NMDA-рецепторов, на генерацию *тэта*- и *гамма*-ритмов.

Ключевые слова: ЦНС, гиппокамп, генные мутации, моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Среди всех видов радиации наиболее высокой биологической эффективностью обладают тяжелые заряженные частицы, входящие в состав галактических космических лучей, а также используемые при радиационной терапии злокачественных опухолей. При оценке рисков радиационного воздействия для космонавтов в ходе межпланетных перелетов, а также пациентов с опухолями головного мозга необходимо иметь в виду возможное формирование нарушений со стороны центральной нервной системы [1]. В экспериментах на ускорителях по облучению лабораторных животных высокоэнергичными ионами железа наблюдался целый ряд эффектов, проявляющихся в выраженных нарушениях пространственной ориентации, снижения когнитивных функций, который связывается с повреждением механизмов синаптической передачи в различных структурах мозга и, прежде всего, в гиппокампе [2]. Нейрофизиологами при изучении нейродегенеративных заболеваний выявлено, что подобные нарушения имеют генетическую природу и связаны с возникновением мутаций в генах, кодирующих белки синаптических рецепторов [3]. Таким образом, можно полагать [4], что радиационные повреждения в генетических структурах нервных клеток в дальнейшем могут привести к синтезу мутантных форм белков, что может сказаться на их нормальном функционировании. Наиболее значимо это будет проявляться при возникновении кластерных повреждений ДНК, обуславливающих грубые нарушения генома и сопровождающихся возникновением структурных мутаций. С учетом этого представляет интерес рассмотреть влияние различных видов мутаций в генах нейронов гиппокампа на состояние синаптических рецепторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объекта исследования был рассмотрен ионотропный рецептор глутамата NMDA (N-метил-D-аспартат), который играет ключевую роль в регуляции синаптической пластичности, обучении и формировании различных видов памяти. Рецептор представляет собой гетеротетрамер из двух субъединиц — NR1 и NR2, кодируемых генами *GRIN1* и *GRIN2*, соответственно. В ходе работы было проведено молекулярно-динамическое (МД) моделирование процесса активации полноатомной структуры рецептора NMDA на базе пакетом NAMD. Рецептор был построен из мутантных форм белков, соответствующих субъединице NR2. При этом анализировались одиночные и двойные точковые мутации, а также одна структурная мутация (делеция), приводящие к нейродегенеративным заболеваниям, таким как различные формы эпилепсии, аутизм, умственная отсталость [3]. Кроме бигетеромерной структуры рецептора NMDA также рассмотрели его тримерные структуры с различной композицией субъединиц NR2a и NR2b, соответствующих генам *GRIN2A* и *GRIN2B*.

Первый этап моделирования осуществлён методом молекулярной динамики с помощью пакета NAMD [5]. Молекулярные структуры закрытых тетрамеров — бигетеромера (субъединицы NR1/NR2b) и тримеромера (субъединицы NR1/NR2a/NR2b) были сформированы на основе кристаллических структур 5FXJ и 5UP2 базы PDB [6], добавлением недостающих аминокислотных остатков путём восстановления и выравнивания программой MODELLER [7]. Процесс, происходящий при активации ионотропных рецепторов, был смоделирован с помощью утилиты TclForces в среде NAMD [5]. Суть такой модели активации заключается в том, что модельная структура лиганд-связывающего домена неактивного рецептора приводится к активному состоянию, заданное шаблоном, прикладывая соответствующие силы к атомам Ca. В качестве шаблонных структур активных состояний были выбраны кристаллические структуры 5FXG для субъединиц NR1/NR2b, 2A5T — для субъединиц NR1/NR2a. При этом для тримерной структуры использованы их комбинация. Таким образом, переход лиганд-связывающего домена в активированную конформацию вызывает открытие ионного канала в трансмембранном домене рецептора NMDA.

Было смоделировано несколько структур NMDA, каждая из которых встроена в фосфолипидную мембрану POPC, которая имеет свойства, аналогичные свойствам мембраны в области синапса. Первая структура была выбрана как нативная; другие имели одну или несколько миссенс-мутаций в субъединице NR2b: p.Arg540His, p.Asn615Ile, p.Val618Gly, а также одну делецию p.Phe671_Gln671del, которая локализована в линкере M3-D2. Эти мутации, соответственно, локализованы внеклеточном глутамат-связующем домене (LBD-D1) и в петле между M2 и M3 (рис. 1), образующей ионный канал, и имеют фенотипы, связанные с различными неврологическими заболеваниями, включая синдром Веста и фокальную эпилепсию [8]. Моделирование методом МД включало четыре этапа: динамика с фиксацией остовных атомов рецептора (20 нс); 20 наносекундная динамика без каких-либо фиксаций атомов; быстрая активация с использованием утилиты TclForces (2 нс); моделирование активных структур (80 нс). Для моделирования свойств водного раствора с удовлетворительной плотностью использовался пакет SOLVATE [9], концентрация ионов – 0,1 моль/л.

В ходе моделирования изменения радиуса ионного канала рассчитывались с помощью программы HOLE [10]. В результате стало возможным оценить разницу между проводимостью открытого ионного канала рецептора нативной и мутантной форм белка. Предполагая, что радиус канала зависит от координаты z вдоль оси симметрии рецептора, которая перпендикулярна мембране, проводимость канала G можно оценить по следующей формуле:

$$\frac{1}{G} = \int_0^L \frac{dz}{\pi \sigma r^2(z)}, \quad (1)$$

где σ – ионная проводимость; L и r – длина ионного канала и эффективный радиус пор соответственно. Таким образом, соотношение проводимости нативных и мутантных форм было оценено по следующей формуле:

$$\frac{G_{mut}}{G_{wild}} = \frac{\int_0^L \frac{dz}{r_{wild}^2}}{\int_0^L \frac{dz}{r_{mut}^2}}. \quad (2)$$

Следует отметить, что таким подходом можно измерять только механическую проницаемость ионных каналов. Для учета блока ионов Mg^{2+} рецепторного канала NMDA необходимо проанализировать особенности его связывания. Здесь мы опираемся на ранее опубликованные результаты [8, 11], выполненные с применением метода теории функционала плотности и доказанные экспериментально.

Анализ геометрии пор с использованием HOLE был рассмотрен с молекулярной структурой, которая была уравновешена после стадии активации. Среднеквадратичное отклонение атомов (RMSD) стабилизировалось при 0,9, 1,0 и 1,16 Å в течение 5 нс для различных мутаций и при 0,95 для рецептора дикого типа. После этого мы усреднили все геометрии, полученные за последние 50 нс моделирования.

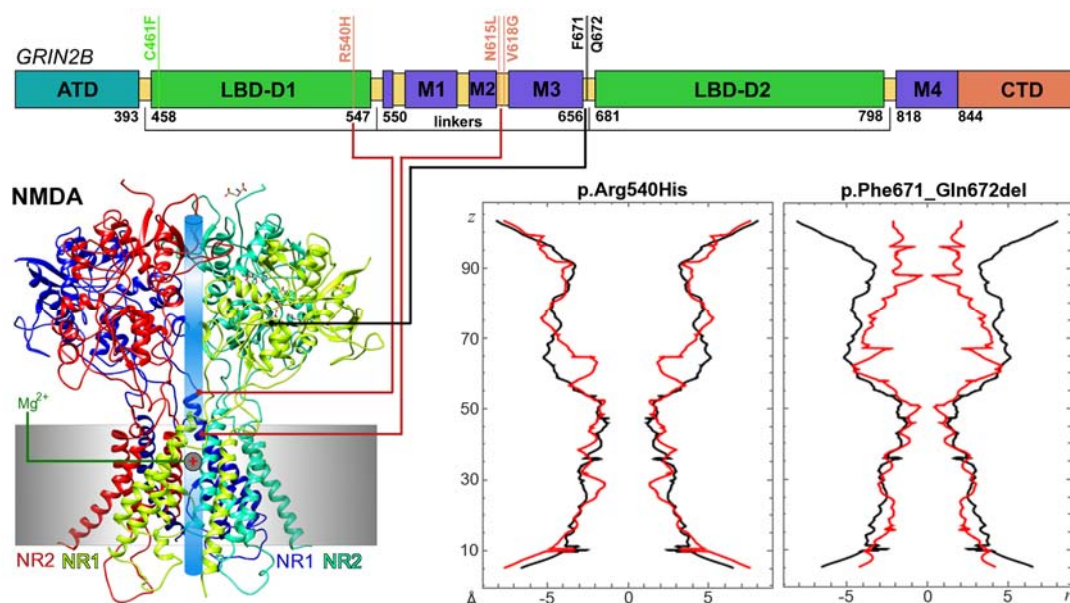


Рисунок 1. NMDA рецептор – тетрамер, состоящий из субъединиц NR1 и NR2. Отмеченные сверху мутации в гене *GRIN2* приводят к нарушению проницаемости ионного канала рецептора. На графиках приведено сравнение геометрии ионного канала для точечной мутации p.Arg540His и делеции p.Phe671_Gln672del (красный) относительно нативного варианта (черный)

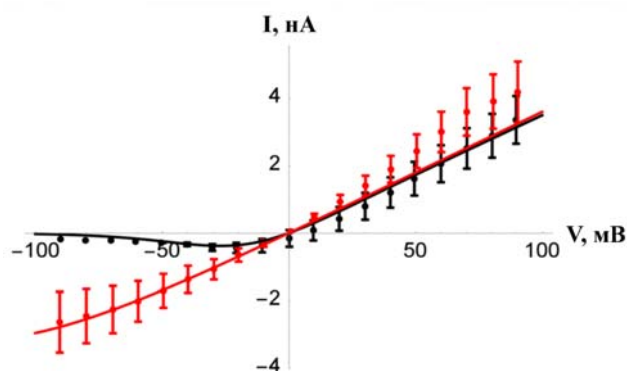


Рисунок 2. Сравнение расчетных (кривые) и экспериментальных (точки) вольт-амперных характеристик NMDA рецептора в случае нативного варианта (черный) и точковой мутации p.Asn615Leu (красный). Экспериментальные значения приведены по данным работы [11]

Количественный анализ геометрии канала в нативной и рассматриваемой мутантных формах рецептора (рис. 1) позволяет оценить соответствующее изменение ионной проводимости, которое определяет формирование потенциала постсинаптического действия.

Макроскопический ионный ток I_m через отдельный рецептор NMDA рассчитывался по формуле [15]

$$I_m = \frac{G_m}{1 + c[\text{Mg}^{2+}] \exp(-qV)} \quad (3)$$

где G_m – максимальная проводимость; V – потенциал постсинаптической мембраны; а c и q – феноменологические константы [15], которые отражают связывание магния и электрохимические свойства, соответственно. Эти параметры обычно выводятся из экспериментальных данных. В ходе расчетов нами изучены вариации G_m и c в соответствии с моделируемой структурой. Значения параметров были нормированы относительно нативного варианта, для которого они составляли $G_m = 1$; $c = 0,28 \text{ mM}^{-1}$ и $q = 0,062 \text{ mV}^{-1}$.

Расчет коэффициентов для проводимости одновалентных ионов (Na^+) на основе реконструкции радиуса пор согласно формулам (2), (3) представлен в таблице 1. Таким образом, максимальная ионная проводимость полностью активированного канала изменяется незначительно между нативным вариантом и рассматриваемыми точечными мутантными формами, но имеет значение для делеции. Здесь мы приходим в соответствие с измерениями, выполненными Феделе и др. [11] (рис. 2). Снижение времени активации вариантов p.Arg540His и p.Asn615Leu может значительно влиять на кинетику рецептора. Соответствующая оценка макроскопического времени открытия/закрытия выходит за рамки примененного молекулярно-динамического метода.

Как упоминалось выше, *тета*- и *гамма*- колебания, возникающие в гиппокампе, имеют фундаментальное значение для обучения и памяти. Существует ряд моделей нейронных сетей гиппокампа различной сложности [12]. Мы использовали модель из [13], воспроизводящую колебания нейронной популяции области гиппокампа СА3 и содержащую в общей сложности 1200 нервных клеток: 800 пирамидных нейронов, 200 oriens lacunosum-moleculare (OLM) и 200 корзинчатых интернейронов. Модель пирамидальных нейронов учитывает некоторые морфологические особенности клетки и поэтому разделена на несколько сегментов: один для базальных дендритов, второй для сомы (тела) клетки, остальные три для апикальных дендритов. Интернейроны описываются односегментными моделями ввиду достаточности такого представления для воспроизведения электрической активности этих клеток.

Динамика единичного элемента модели определяется уравнениями типа Ходжкина-Хаксли. Выбор токов и их параметров не изменился по сравнению с предыдущими работами [13, 14]. Все ячейки содержали ток утечки, натриевые и калиевые каналы с задержкой выпрямления тока для генерации потенциалов действия. Во всех группах пирамидальных нейронов был добавлен калиевый ток А-типа для быстрой инактивации потенциалов действия, гиперполяризационный ток Н-типа для обеспечения взрывной активности. OLM-клетки

Таблица 1. Параметры для расчета NMDA ионного тока

Мутации	N_m/N_b	B_b	$u, \text{\AA}$	G_{mut}/G_{nat}	c, mM^{-1}	q, mV^{-1}
Нативная форма	1	2	1,87	1,00	0,280	0,062
p.Arg540His	2	2	1,99	0,93	0,093	0,058
p.Asn615Leu	4	1	4,60	1,03	0,018	0,025
p.Val618Gly	3	1	1,95	1,06	0,025	0,059
p.Phe671 Gln672del	1	2	4,15	0,37	0,280	0,028

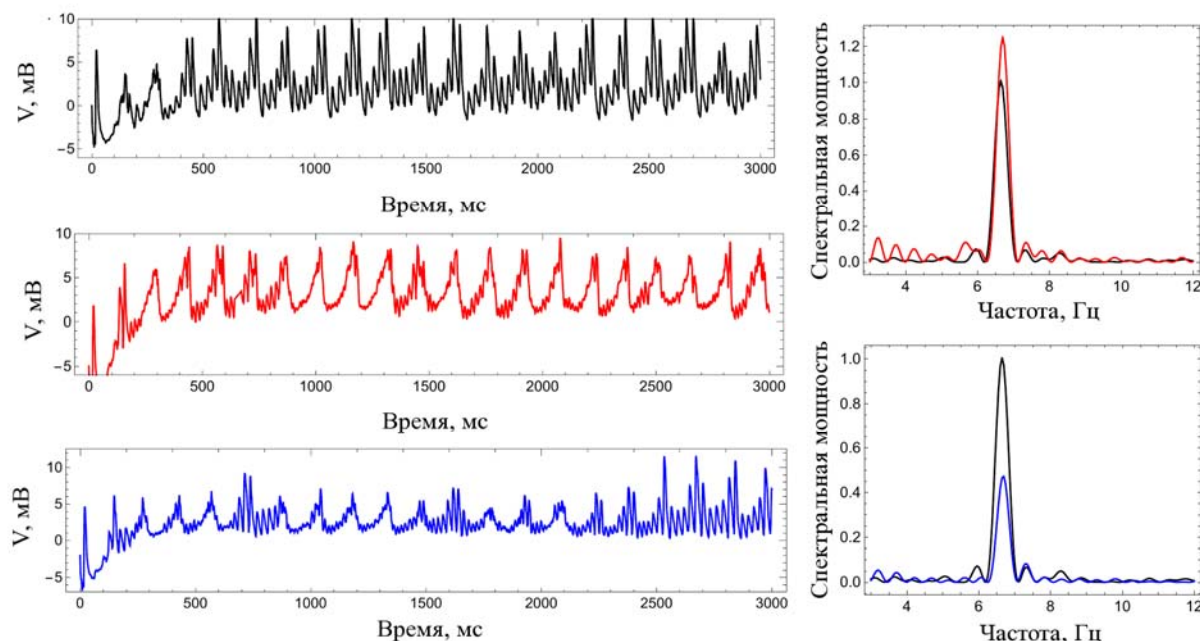


Рисунок 3. Расчет потенциала локального поля V коллективных колебаний нейронной сети и соответствующих спектров в θ -диапазоне частот для случаев нативной формы рецептора (черный), мутации p.Arg540His (красный) и делеции p.Phe671_Gln672del (синий)

дополнительно имеют калиевый ток для длительной деактивации, высокопороговый кальций-зависимый калиевый ток и гиперполяризационный ток h -типа.

Все нейроны в сети связаны синаптическими контактами, образующими обратные связи. Пространственная архитектура сети принципиально не отличается от реальной морфологии. Все пирамидальные нейроны посылают возбуждающие сигналы в интернейроны и другие пирамидальные клетки через синапсы AMPA и NMDA. Интернейроны связаны друг с другом и пирамидальными нейронами с помощью тормозных синапсов GABA(A). Для имитации входных сигналов от ЕС и других областей головного мозга к пирамидальным клеткам и OLM-интернейронам добавляется стимуляция постоянного тока, соответственно. Для модуляции θ -ритма от MS к интернейронам применялись ритмические сигналы GABA(A). Код модели 139421 из базы ModelDB был изменен в среде моделирования NEURON в соответствии с расчетными свойствами NMDA-рецепторов по формуле (3).

Для моделирования коллективных колебаний (ритмов), генерируемых нейронными сетями, рассчитывался потенциал локального поля, представляющий собой суммарную активность по всем пирамидальным клеткам областей CA1-CA3 гиппокампа. После выполнения Фурье-преобразования рассчитывалась спектральная мощность сигнала в частотных диапазонах 4-7 Гц (θ -ритм) и 30-50 Гц (γ -ритм). В результате удалось исследовать влияние мутаций, кодирующих белковые субъединицы NMDA-рецепторов, на генерацию ритмов нейронной сетью (рис. 3). Все исследованные виды мутаций приводили к подавлению γ -осцилляций. Рассмотренные «эпилептические» мутации вызывают либо небольшое повышение частоты θ -ритма (p.Arg540His), либо изменение спектра колебаний (p.Asn615Leu, p.Val618Gly). Однако было выявлено, что подача в нейронную сеть сигнала-возмущения может вызвать очень сильное изменение спектрального состава колебания (эпилептический разряд), что согласуется с клиническими данными [8, 11]. Это объясняется отсутствием связывания магния, что приводит к исчезновению порога в вольт-амперной характеристике одиночного рецептора и перевозбуждению нейронной сети. В случае делеций, напротив, было выявлено падение спектральной мощности θ -ритма примерно в два раза. Таким образом, сложные генетические повреждения в наибольшей степени будут приводить к ухудшению работы ионного канала NMDA-рецептора, что может объяснить нарушения функций ЦНС после действия плотно-ионизирующих излучений [2, 4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен подход, позволяющий количественно учесть влияние мутаций в генах нейронов гиппокампа на состояние синаптических рецепторов. Модельный подход был опробован на известных из эксперимента эффектах от мутаций в трансмембранном домене, приводящих к эпилептическим расстройствам. Анализ полученных структур позволил определить изменение проводимостей ионного канала, которые сильно уменьшались в случае делеции. Точковые мутации вызывают незначительные изменения проводимости ионного канала, однако, в ряде случаев могут приводить к нарушению связывания ионов магния. По характеру активности нейронной сети и соответствующей электроэнцефалограмме можно судить о макроскопическом эффекте конкретного типа мутантной структуры.

Полученные результаты могут быть применены при выявлении причин нейродегенеративных заболеваний, а также при оценке возможных когнитивных нарушений, возникающих в результате воздействия радиации и других негативных факторов внешней среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-29-01007).

Список литературы / References:

1. Григорьев А.И., Красавин Е.А., Островский М.А. К вопросу о радиационном барьере при пилотируемых межпланетных полетах. *Вестник Российской академии наук*, 2017, т. 87, № 1, с. 65-69. [Grigoriev A.I., Krasavin E.A., Ostrovsky M.A. On the radiation barrier in manned interplanetary flights. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2017, vol. 87, no. 1, pp. 65-69. (In Russ.)]
2. Shi L., Adams M.M., Long A., Carter C.C., Bennett C., Sonntag W.E., Nicolle M.M., Robbins M., D'Agostino R.Jr., Brunso-Bechtold J.K. Spatial learning and memory deficits after whole-brain irradiation are associated with changes in NMDA receptor subunits in the hippocampus. *Radiat. Res.*, 2006, vol. 166, pp. 892-899.
3. Burnashev N., Szepietowski P. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2015, vol. 20, pp. 73-82.
4. Boreyko A.V., Bugay A.N., Bulanova T.S., Dushanov E.B., Jezkova L., Kulikova E.A., Smirnova E.V., Zadneprianetc M.G., Krasavin E.A. Clustered DNA double-strand breaks and neuroradiobiological effects of accelerated charged particles. *Physics of Particles and Nuclei Letters*, 2018, vol. 15, no. 5, pp. 551-561.
5. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, 2005, vol. 26, no. 16, pp. 1781-1802.
6. Tajima N., Karakas E., Grant T., Simorowski N., Diaz-Avalos R., Grigorieff N., Furukawa H. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature*, 2016, vol. 534, no. 7605, pp. 63-68.
7. Sali A., Blundell T. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 1993, vol. 234, no. 3, pp. 779-815.
8. Lemke J.R., Hendrickx R., Geider K., Laube B., Schwake M., Harvey R.J., James V.M., Pepler A., Steiner I., Hortnagel K., Neidhardt J., Ruf S., Wolff M., Bartholdi D., Caraballo R., Platzer K., Suls A., Jonghe P.D., Biskup S., Weckhuysen S. GRIN2B mutations in west syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Ann Neurol.*, 2014, vol. 75, no. 1, pp. 147-154.
9. Grubmüller H., Groll V. Solvate. *Max Plank Institute for Biophysical Chemistry*, 2013. URL: <http://www.mpibpc.mpg.de/grubmueller/solvate>
10. Smart O.S., Neduvilil J.G., Wang X., Wallace B.A., Sansom M.S. HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. of Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, no. 6, pp. 354-360.
11. Fedele L., Newcombe J., Topf M., Gibb A., Harvey R.J., Smart T.G., Disease-associated missense mutations in GluN2B subunit alter NMDA receptor ligand binding and ion channel properties. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, p. 957.
12. Cutsuridis V., Graham B.P., Cobb S., Vida I. Hippocampal Microcircuits. *A Computational Modeler's Resource Book*. Springer-Verlag New York, 2010. ISBN: 978-1-4419-0995-4. P. XI, 617.
13. Neymotin S.A., Lazarewicz M.T., Sherif M., Contreras D., Finkel L.H., Lytton W.W. Ketamine disrupts theta modulation of gamma in a computer model of hippocampus. *J. Neurosci.*, 2011, vol. 31, no. 32, pp. 11733-11743.
14. Tort A.B., Rotstein H.G., Dugladze T., Gloveli T., Kopell N.J. On the formation of gamma-coherent cell assemblies by oriens lacunosum-moleculare interneurons in the hippocampus. *PNAS*, 2007, vol. 104, no. 33, pp. 13490-13495.
15. Jahr C., Stevens C. Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J. Neurosci.*, 1990, vol. 10, no 9, pp. 3178-3182.

EFFECT OF MUTANT FORMS OF SYNAPTIC NMDA RECEPTORS ON OSCILLATIONS IN NEURAL NETWORKS

Aksenova S.V., Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

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

Abstract. In the present work, molecular dynamics simulation of the ion channel activation of mutant forms of the NMDA receptor was carried out. The bi and triheteromeric forms of the receptor with different compositions of the subunits were analyzed. The conductivity of the ion channel was calculated according to the HOLE program, as well as by analyzing the binding of magnesium ions. The analysis of the structures obtained made it possible to determine the change in the conductivities of the ion channel, which strongly decreased in the case of double point mutations and deletions. The data obtained were used in the hippocampal neural network model in the NEURON package. As a result, it was possible to investigate the effect of mutations encoding the protein subunits of the NMDA receptors on the generation of *theta* and *gamma* rhythms.

Key words: CNS, hippocampus, gene mutations, modelling.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В НЕРВНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ

Батмунх М.¹, Баярчимэг Л.¹, Бугай А.Н.¹, Лхагва О.²

¹Объединенный институт ядерных исследований
ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: batmunkh@jinr.ru

²Национальный университет Монголии
ул. Университет, 1, г. Улан-Батор, 210646, Монголия

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. В данной работе исследовано прохождение треков заряженных частиц через различные области гиппокампа крыс, который включал основные типы клеток различной морфологии. Для каждой модели нейрона смоделированы клеточное тело (сома), содержащее ядерную ДНК, аксон и дендриты, с распределенными на них шипиками и синаптическими рецепторами. С использованием метода Монте-Карло в пакете Geant4 моделировались физико-химические процессы в нейронах гиппокампа и образуемых ими нейронных сетях при облучении заряженными частицами в широком диапазоне линейной передачи энергии (ЛПЭ). Также проведен расчет формирования молекулярных повреждений различной природы в чувствительных структурах нервных клеток с учетом процессов радиолитического повреждения воды после радиационного поражения. Предсказано, что выход кластерных однонитевых разрывов ДНК, включающих повреждения оснований, максимален при значениях ЛПЭ в пределах 20-50 кэВ/мкм. Максимальный выход двунитевых разрывов ДНК на единицу поглощенной дозы наблюдается при значениях ЛПЭ в пределах 100-200 кэВ/мкм, а наибольшая часть кластерных двунитевых разрывов ДНК, включающих повреждения оснований, реализуется в области ЛПЭ около 300 кэВ/мкм. Полученные результаты находятся в согласии с известными экспериментальными данными.

Ключевые слова: нейроны, трек заряженных частиц, кластерное повреждение ДНК, ОБЭ.

ВВЕДЕНИЕ

Среди современных проблем, связанных с действием радиации на человека, наиболее острым и нерешенным является вопрос о радиационном поражении центральной нервной системы (ЦНС) и соответствующих нарушениях когнитивных функций [1]. Возникновение интереса к данной теме связано с развитием космических программ длительных пилотируемых полетов за пределами магнитосферы Земли, включающими освоение Луны и Марса. Наибольшую опасность для здоровья человека представляют тяжелые заряженные частицы с очень высокой степенью биологической эффективности, входящие в состав потоков галактических космических лучей (ГКЛ), а также используемые в радиационной терапии [2-4]. В связи со сложностью проведения соответствующих экспериментов на живых организмах для решения рассматриваемых проблем требуется развитие методов математического и компьютерного моделирования.

Большую проблему представляет выяснение молекулярных и клеточных механизмов, вызывающих нарушение поведенческих функций и памяти после радиационного воздействия. Выполнение таких исследований связано, прежде всего, с реализацией экспериментов на ускорителях тяжелых заряженных частиц. К известным результатам можно отнести изменение морфологии нейронных сетей в различных отделах головного мозга, потерю дендритных ветвей и дендритных шипиков, что ограничивает передачу сигналов [5-7]. Изучалась также корреляция снижения когнитивных функций в связи с тяжелыми повреждениями ДНК, в особенности двунитевыми разрывами, а также изменением в профиле экспрессии генов [8] и генетических мутаций на белковые структуры, формирующих ионные каналы синаптических рецепторов [9, 10]. Ясно, что полноценное изучение наблюдаемых явлений представляется крайне затруднительным без применения методов математического моделирования и вычислительного эксперимента. Современное состояние исследований в области математического моделирования действия заряженных частиц на ЦНС можно охарактеризовать как находящееся лишь на начальных стадиях. Опубликованы данные по микродозиметрическим расчетам энерговыделения в треках тяжелых заряженных частиц поражающих нейроны головного мозга. В работах отечественных [11, 12] и американских специалистов [13] разрабатывались новые подходы оценки дозовой нагрузки в различных типах нервных клеток согласно детально воссозданной пространственной морфологии с применением различных программных кодов Монте-Карло.

Моделирование индукции повреждений молекулы ДНК заряженными частицами в традиционных объектах исследований, примерами которых являются фибробласты кожи, лимфоциты периферической крови, некоторые виды раковых клеток, бактериальных клеток и др. представляет собой наиболее активно развивающуюся область. С применением различных Монте-Карло программных кодов взаимодействия излучения с веществом (PARTRAC, Geant4-DNA, RITRACKS и др.) хорошо исследовано количественное и пространственное распределение первичных однонитевых, двунитевых и кластерных повреждений цепи ДНК в таких объектах [14-19]. Однако, возникновение первичных молекулярных повреждений при оксидации критических структур сложных и высокоспециализированных клеток, таких как нейроны, ранее не рассматривалось. Целью настоящей

работы является разработка вычислительных методов, позволяющих смоделировать совокупность процессов, протекающих в структурах нервной системы в результате действия тяжелых заряженных частиц. Для расчета дозиметрических характеристик очень важно корректно учесть как геометрию наиболее чувствительных отделов головного мозга (гиппокамп, префронтальная кора и т.д.), так и морфологию каждого типа клеток. В целях оценки начальных радиационно-индуцированных эффектов в ЦНС нами разработан модельный подход, учитывающий реальную морфологию нейронов в различных отделах гиппокампа крыс от молекулы до популяции клеток при прохождении треков заряженных частиц. Предложенный метод позволяет смоделировать начальные физические, физико-химические и химические процессы в нейронах гиппокампа различной морфологии (пирамидальных нейронах, зрелых и незрелых гранулярных клетках, мшистых клетках, нервных стволовых клетках), количественно оценить поглощенную дозу и выход продуктов радиолиза при действии тяжелых заряженных частиц, соответствующих реальным спектрам ГКЛ (от протонов до тяжелых ионов). Кроме того, разработан метод расчета, учитывающий как диффузию и превращения образовавшихся продуктов радиолиза, так и их химические взаимодействия со сложными молекулами-мишенями, такими как ДНК, ионные каналы, синаптические рецепторы и др. Такой подход делает возможным анализ тонкой структуры кластерных повреждений ДНК от энергосвечения и продуктов радиолиза воды, а также разделить механизмы их формирования на прямые и косвенные. Для проведения вычислительных экспериментов формирования молекулярных повреждений в нервных клетках при воздействии тяжелых заряженных частиц нами использовались суперкомпьютеры ОИЯИ [20].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полное описание реализации геометрии нейрона в Geant4 и физико-химических процессах внутри структуры нейрона выполнено в наших ранее опубликованных работах [21, 22]. Более детальный расчет энергосвечения и продуктов радиолиза в треках заряженных частиц, попадающих в молекулярные структуры ДНК на уровне отдельных нейронов, проводился с использованием полноатомных структурных моделей ядерной ДНК в нейронах гиппокампа крысы, которая содержит 5486.6 млрд.п.н. [23]. Координаты и объем ДНК в длине нуклеосомного повтора (NRL) нейронов крысы рассчитываются из атомных координат нуклеосомы и линкерной ДНК (код PDB: *1kx5* и *1fzx*). Известно, что энергосвечение выше определенного порога в цепях или основаниях ДНК вызывает в ней различные виды прямых повреждений [24]. Кроме того, гидроксильные радикалы ($\bullet\text{OH}$) и гидратированные электроны (e^-_{aq}) очень активно вступают в реакцию с цепями ДНК и нуклеотидными основаниями [25], формируя косвенные повреждения. Для вероятности прямого типа повреждения мы использовали экспоненциальную функцию $(1 - \exp(-0,4 \cdot \varepsilon))^{16}$, где ε - энергосвечение в цепочках или основаниях ДНК. Вероятность косвенного повреждения от реактивных продуктов ($\bullet\text{OH}$ и e^-_{aq}), взаимодействующих с цепями ДНК и основаниями, составляет 20% и 80% соответственно [24]. Мы ограничили время моделирования химической стадии до одной наносекунды для взаимодействия реактивных продуктов ($\bullet\text{OH}$ и e^-_{aq}) с молекулами ДНК. После предыдущих шагов прямое или косвенное повреждение, вызванное цепями или основаниями ДНК, рассматривается как одонитевой разрыв (ОР) или повреждение основания (ПО). Если два ОР находятся в противоположных цепях в пределах 10 п.н. друг от друга, это будет считаться двунитевым разрывом (ДР). Кластерный ДР ДНК образован двумя или более повреждениями в пределах данного расстояния от ДР. Ядро нейрона облучалось протонами (^1H), ионом гелия (^4He), ионом углерода (^{12}C) и ионом железа (^{56}Fe) в широком диапазоне линейной передачи энергии (ЛПЭ). На основании представленных данных рассчитывалась относительная биологическая эффективность (ОБЭ), определяемая отношением выхода индукции ДР ДНК для тяжелых заряженных частиц и γ -излучений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 изображены популяции нейронов в различных областях гиппокампа крыс и отдельных нейронах области CA1 гиппокампа при прохождении треков заряженных частиц. Результаты моделирования оценки энергосвечения и дозовой нагрузки в отдельных нейронах и в нейронных сетях гиппокампа при действии тяжелых заряженных частиц с различными характеристиками было выполнено в предыдущих работах нашей группы [11, 21, 22]. Моделирование выхода продуктов радиолиза воды в чувствительных структурах нейронов, образующих синаптические контакты и структуры ДНК после облучения описано в работах [26-28]. В настоящей работе данные результаты были расширены путем расчета формирования и кластеризации молекулярных повреждений различной природы в ДНК после радиационного поражения. На данном уровне сложности полученные данные дали возможность более детально рассчитать распределение первичных повреждений ДНК в клеточном ядре, таких как одонитевые и двунитевые разрывы, различные повреждения оснований. Результаты расчетов, отражающие относительные вклады прямых и косвенных ПО и ОР ДНК в клеточном ядре в зависимости от ЛПЭ различных заряженных частиц, приведены на рисунке 2. В этом случае выявлено удовлетворительное согласие между результатами моделирования и известными экспериментальными данными по изучению прямого и косвенного действия радиации на гибель клеток [29].

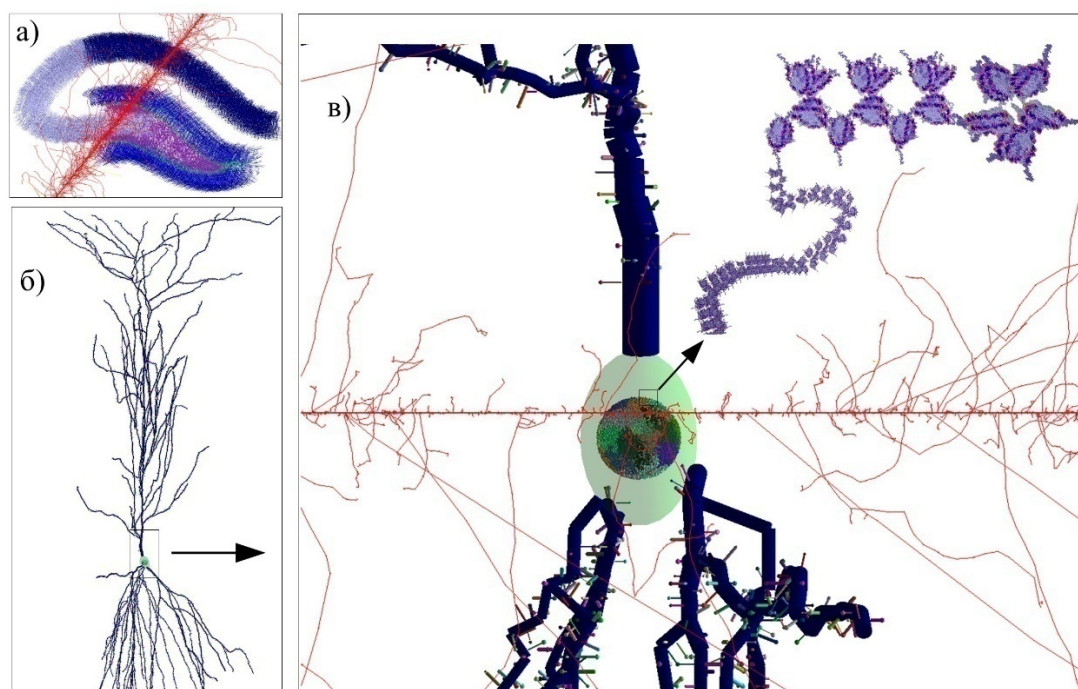


Рисунок 1. Моделирование энерговыделения в популяции нервных клеток гиппокампа крыс (а) и отдельных нейронах (б) при облучении. Нейроны в зубчатой извилине – выделены синим, в субгранулярной зоне – зеленым, в хилусе – фиолетовым, в СА1-области – темно синим и в СА2/СА3-областях – светло синим. Структура трека ионов ^{56}Fe (600 МэВ/нук) выделена красным. Модель ядра СА1 пирамидного нейрона (б, в), заполнена сферическими доменами хроматина

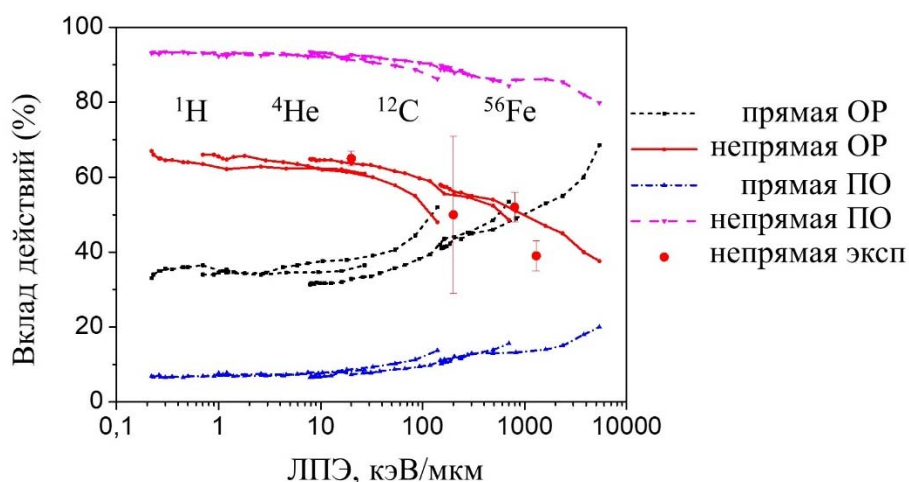


Рисунок 2. Относительный вклад различных типов прямых и непрямых повреждений ДНК в ядре клетки в зависимости от ЛПЭ различных заряженных частиц. Доля непрямых повреждений ДНК уменьшается при увеличении ЛПЭ, что согласуется с экспериментальными значениями (точки)

Анализ распределения и классификации установившихся первичных молекулярных повреждений и их количественного и качественного состава приведены на рисунке 3. Выход ПО и ОР ДНК уменьшается при увеличении ЛПЭ. Выход кластерных одонитевых разрывов (кОР) ДНК, включающих ПО, максимален при небольших значениях ЛПЭ в пределах 20-50 кэВ/мкм. Максимальный выход ДР ДНК на единицу поглощенной дозы излучения наблюдается при больших значениях ЛПЭ в пределах 100-200 кэВ/мкм, а максимальный выход кластерных ДР (кДР) ДНК реализуется в области ЛПЭ около 300 кэВ/мкм. Полученные результаты находятся в согласии с известными экспериментальными данными на клетках млекопитающих, а также нервных клетках гиппокампа крысы [30-34]. ДР и особенно кДР ДНК, как известно, является молекулярным субстратом формирования летальных событий для клетки, различного вида структурных мутаций генов, лежащих в основе многих радиационно-индуцированных эффектов. Поэтому в данной работе анализировалась зависимость ОБЭ тяжелых заряженных частиц от ЛПЭ, оцениваемые по критерию индукции ДР и кДР ДНК в клеточном ядре на единицу поглощенной дозы излучения. На рисунке 4 представлены данные о зависимости коэффициентов ОБЭ

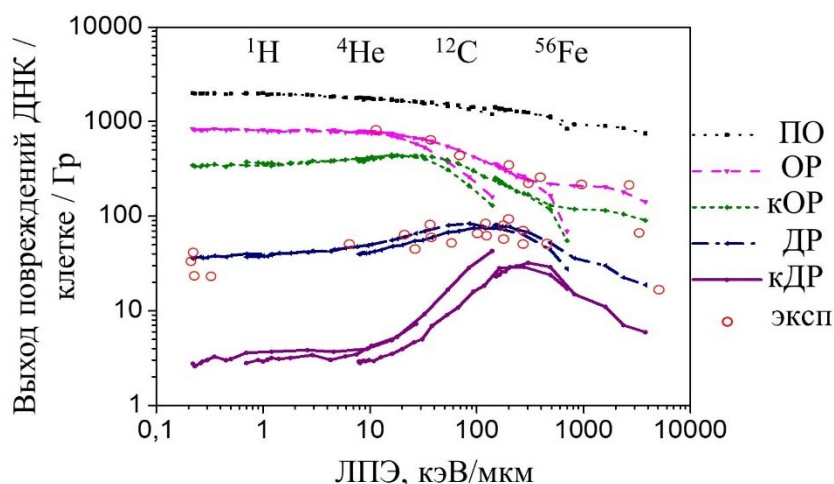


Рисунок 3. Зависимости выхода повреждений ДНК в клеточном ядре от ЛПЭ заряженных частиц на единицу поглощенной дозы: сравнение результатов моделирования (разные линии с символами) и экспериментальных данных (точки)

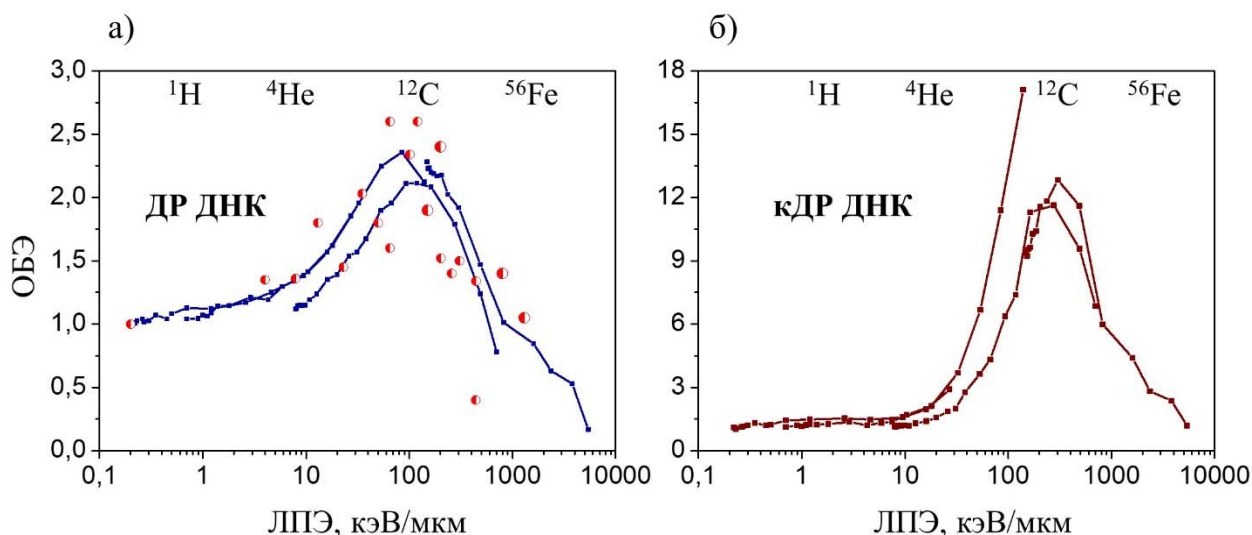


Рисунок 4. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ заряженных частиц по критерию индукции ДР (а) и кДР ДНК (б): сравнение результатов моделирования (линии с символами) и экспериментальных данных (крупные точки)

от ЛПЭ для различных заряженных частиц. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ по критерию индукции ДР и кДР ДНК описываются кривыми с локальным максимумом. Максимальные значения ОБЭ частиц по индукции ДР локализуются в области ЛПЭ около 120 кэВ/мкм, а индукции кластерных ДР ДНК при ЛПЭ примерно 300 кэВ/мкм. Показано, что эффективность выхода ДР, образующихся при действии тяжелых заряженных частиц в два и более раз выше, чем при облучении гамма-квантами, а выхода кластерных ДР ДНК – примерно в десять раз. Результаты моделирования согласуются с известными экспериментальными данными по индукции ДР ДНК в зависимости от линейной передачи энергии ускоренных заряженных частиц [29, 35-37].

Таким образом, можно заключить, что разработанный нами метод позволил смоделировать первичные этапы радиационного воздействия в различных частях нервных клеток с реальной морфологией, возникающих в ходе различных физико-химических процессов (ионизации атомов и молекул, генерации вторичных частиц, молекулярные возбуждения, разрывов химических связей, формирования и диффузионного переноса продуктов радиолитической воды и др.) и количественно оценить распределение поглощенной дозы и различных продуктов радиолитической воды в отдельных нейронах гиппокампа крысы, а также проанализировать ключевые типы радиационных повреждений в молекулярных структурах на уровне отдельных нейронов после прохождения треков заряженных частиц. Проведенные расчеты позволили определить качественное и количественное их распределение с учетом формирования пространственных кластеров, трудно поддающихся репарации. Расчетные данные по выходу кластерных повреждений ДНК, возникающих при прохождении через клетку тяжелых заряженных частиц были использованы для вычисления величины ОБЭ тяжелых заряженных частиц с ростом их ЛПЭ и оценивались по критерию индукции ДР и кластерных ДР ДНК на клетке и на единицу поглощенной дозы излучения. Эти результаты хорошо согласуются с известными экспериментальными данными на клетках млекопитающих, а

также в нервных клетках грызунов. Данные результаты являются фундаментальной базой для оценки дальнейших последствий действия излучения, таких как клеточная гибель, нарушение нейрогенеза, формирование генных и структурных мутаций, развитие оксидативного стресса, нейровоспалительных процессов и т.д., которые в совокупности оказывают влияние на осуществление когнитивных функций структурами ЦНС.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-29-01007). Расчеты проводились на базе гетерогенной вычислительной платформы «HybriLIT» и суперкомпьютера «Говорун» (ЛИТ, ОИЯИ).

Список литературы / References:

1. Greene-Schloesser D., Robbins M.E., Peiffer A.M., Shaw E.G., Wheeler K.T., Chan M.D. Radiation-induced brain injury: a review. *Frontiers in oncology*, 2012, vol. 2, pp. 1-18. DOI: 10.3389/fonc.2012.00073.
2. Григорьев А.И., Красавин Е.А., Островский М.А. К оценке риска биологического действия галактических тяжёлых ионов в условиях межпланетного полёта. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, 2013, т. 99, № 3, с. 273-280. [Grigoriev A.I., Krasavin E.A., Ostrovskiy M.A. To an assessment of risk of galactic heavy ions biological effect in interplanetary flight. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal*, 2013, vol. 99, no. 3, pp. 273-280. (In Russ.)]
3. Cucinotta F.A., Alp M., Sulzman F.M. et al. Space radiation risks to the central nervous system. *Life Sci Sp Res.*, 2014, vol. 2, pp. 54-69. DOI: 10.1016/j.lssr.2014.06.003.
4. Nelson G.A. Space Radiation and Human Exposures. A Primer. *Radiat Res.*, 2016, vol. 185, no. 4, pp. 349-58. DOI: 10.1667/RR14311.1.
5. Parihar V.K., Allen B.D., Caressi C. Cosmic radiation exposure and persistent cognitive dysfunction. *Sci Rep.*, 2016, vol. 6, p. 34774. DOI: 10.1038/srep34774.
6. Vlkolinsky R., Titova E., Krucker T. et al. Exposure to ^{56}Fe -particle radiation accelerates electrophysiological alterations in the hippocampus of APP23 transgenic mice. *Radiat Res.*, 2010, vol. 173, pp. 342-352. DOI: 10.1667/RR1825.1.
7. Rudbeck E., Nelson G.A., Sokolova I.V., et al. 28Silicon radiation impairs neuronal output in CA1 neurons of mouse ventral hippocampus without altering dendritic excitability. *Radiat Res.*, 2014, vol. 181, no. 4, pp. 407-415. DOI: 10.1667/RR13484.1.
8. Zhang L., Chen L., Sun R. et al. Effects of expression level of DNA repair-related genes involved in the NHEJ pathway on radiation-induced cognitive impairment. *J. Radiat. Res.*, 2013, vol. 54, no. 2, pp. 235-242. DOI: 10.1093/jrr/rrs095.
9. Boreyko A.V., Bugay A.N., Bulanov T.S., Dushanov E.B., Jezkova L., Kulikova E.A., Smirnova E.V., Zadneprianec M.G., Krasavin E.A. Clustered DNA double-strand breaks and neuroradiobiological effects of accelerated charged particles. *Phys. Part. Nucl. Lett.*, 2018, vol. 15, p. 551.
10. Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B. Effect of mutant NMDA receptors on the oscillations in a model of hippocampus. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019, vol. 17, no. 1, p. 1940003
11. Batmunkh M., Belov O.V., Bayarchimeg L. et al. Estimation of the spatial energy deposition in CA1 pyramidal neurons under exposure to 12C and 56Fe ion beams. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, 2015, vol. 8, pp. 498-507. DOI: 10.1016/j.jrras.2015.05.008.
12. Bayarchimeg L., Batmunkh M., Belov O.V. Reconstruction of the neural cell morphology for microdosimetric calculations. *ICTP HRCS ppt*, 2013, vol. 1, pp. 21-22. Retrieved from <http://handsonresearch.org/>
13. Alp M., Parihar V.K., Limoli C.L., et al. Irradiation of Neurons with High-Energy Charged Particles: An In Silico Modeling Approach. *PLoS Comput Biol.*, 2015, vol. 11, no. 8, p. e1004428. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004428.
14. Nakajima N.I., Brunton H., Watanabe R. et al. Visualisation of γH2AX Foci Caused by Heavy Ion Particle Traversal; Distinction between Core Track versus Non-Track Damage. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 8, p. e70107. DOI: 10.1371/journal.pone.0070107.
15. Friedland W., Schmitt E., Kundrat P. et al. Comprehensive track-structure based evaluation of DNA damage by light ions from radiotherapy-relevant energies down to stopping. *Sci Rep.*, 2017, vol. 7, p. 45161.
16. Saha J., Wilson P., Thieberger P. et al. Biological Characterization of Low-Energy Ions with High-Energy Deposition on Human Cells. *Radiat Res.*, 2014, vol. 182, no. 3, pp. 282-291. DOI: 10.1667/rr13747.1.
17. Meylan S., Incerti S., Karamitros M. et al. Simulation of early DNA damage after the irradiation of a fibroblast cell nucleus using Geant4-DNA. *Sci Rep.*, 2017, vol. 7, p. 11923.
18. Lampe N., Karamitros M., Breton V. et al. Mechanistic DNA damage simulations in Geant4-DNA part 2: Electron and proton damage in a bacterial cell. *Phys Med.*, 2018, vol. 48, pp. 146-155.
19. Watanabe R., Rahmanian S., Nikjoo H. Spectrum of Radiation-Induced Clustered Non-DSB Damage – A Monte Carlo Track Structure Modeling and Calculations. *Radiat Res.*, 2015, vol. 183, no. 5, pp. 525-540. DOI: 10.1667/rr13902.1.
20. Adam Gh., Bashashin M., Belyakov D. et al. IT ecosystem of the HybriLIT heterogeneous platform for high performance computing and training of IT specialists. *Selected Papers of the 8th International Conference «Distributed Computing and Grid-technologies in Science and Education» (GRID 2018)*, 2018, CEUR-WS.org/Vol.2267
21. Bayarchimeg L., Batmunkh M., Belov O.V., Lkhagva O., Simulation of radiation damage to neural cells with Geant4-DNA. *EPJ Web Conf.*, 2018, vol. 173, no. 2, p. 05005. DOI: 10.1051/epjconf/201817305005.

22. Batmunkh M., Aksenova S.V., Bayarchimeg L., Bugay A.N., Lkhagva O. Optimized Neuron Models for Estimation of Charged Particle Energy Deposition in Hippocampus. *Phys. Med.*, 2019, vol. 57, pp. 88-94, DOI: 10.1016/j.ejmp.2019.01.002
23. Gibbs R.A. et al. [Rat Genome Sequencing Project Consortium] Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 2004, vol. 428, pp. 493-521.
24. Nikjoo H., O'Neill P., Goodhead D., Terrissol M. Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 71, p. 467.
25. Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B. Critical review of rateconstants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH/O) in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1988, vol. 17, p. 513.
26. Bayarchimeg L., Bugay A., Batmunkh M., Lkhagva O. Evaluation of radiation-induced effects in membrane ion channels and receptors. *Phys. Part. Nucl. Lett.*, 2019, vol. 16, pp. 54-62. DOI: 10.1134/S1547477119010059.
27. Batmunkh M., Bugay A.N., Bayarchimeg L., Aksenova S.V., Lkhagva O. Computer Modeling of Radiation – Induced Damage to Hippocampal Cells. *Mong. J. Phys.*, 2019, vol. 5, pp. 76-82.
28. Batmunkh M., Bayarchimeg L., Bugay A.N., Lkhagva O. Monte Carlo track structure simulation in studies of biological effects induced by accelerated charged particles in the central nervous system. *EPJ WoC*, 2019, vol. 204, p. 04008. DOI: 10.1051/epjconf/201920404008.
29. Hirayama R., Ito A., Tomita M. et al. Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High-LET Radiations. *Radiat Res.*, 2009, vol. 171, no. 2, pp. 212-218. DOI: 10.1667/rr1490.1.
30. Roots R., Holley W., Chatterjee A. et al. The Formation of Strand Breaks in DNA after High-LET Irradiation: A Comparison of Data from in Vitro and Cellular Systems. *International Journal of Radiation Biology*, 1990, vol. 58, no. 1, pp. 55-69. DOI: 10.1080/09553009014551431.
31. Alloni D., Campa A., Friedland W. et al. Integration of Monte Carlo Simulations with PFGE Experimental Data Yields Constant RBE of 2.3 for DNA Double-Strand Break Induction by Nitrogen Ions between 125 and 225 keV/μm LET. *Radiat Res.*, 2013, vol. 179, no. 6, pp. 690-697. DOI: 10.1667/r3043.1.
32. Hoglund E., Stenerlow B. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in normal human skin fibroblasts after exposure to radiation of different linear energy transfer: possible roles of track structure and chromatin organization. *Radiat Res.*, 2001, vol. 155, pp. 818-25.
33. Kozhina R.A., Chausov V.N., Kuzmina E.A., Boreyko A.V. Induction and repair of DNA double-strand breaks in hippocampal neurons of mice of different age after exposure to ⁶⁰Co -rays *in vivo* and *in vitro*. *EPJ Web Conf.*, 2018, vol. 177, p. 06001.
34. Bulanova T.S. Boreyko A.V., Zadneprianets M.G. et al. Formation of DNA Double-Strand Breaks in Rat Brain Neurons after Irradiation with Krypton Ions (⁷⁸Kr). *Phys. Part. Nuclei Lett.*, 2019, vol. 16, p. 402. DOI: 10.1134/S1547477119040083.
35. Löbrich M., Cooper P.K., Rydberg B. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1996, vol. 70, no. 5, pp. 493-503.
36. Frankenberg D., Brede H.J., Schrewe U.J. et al. Induction of DNA Double-Strand Breaks by ¹H and ⁴He Ions in Primary Human Skin Fibroblasts in the LET Range of 8 to 124 keV/μm. *Radiat Res.*, 1999, vol. 151, no. 5, pp. 540-549.
37. Campa A., Alloni D., Antonelli F. et al. DNA fragmentation induced in human fibroblasts by ⁵⁶Fe ions: experimental data and Monte Carlo simulations. *Radiat Res.*, 2009, vol. 171, no. 4, pp. 438-445. DOI: 10.1667/RR1442.1.

COMPUTER SIMULATION OF THE DNA DAMAGE FORMATION IN NEURAL CELLS UNDER EXPOSURE TO HEAVY CHARGED PARTICLES

Batmunkh M.¹, Bayarchimeg L.¹, Bugay A.N.¹, Lkhagva O.²

¹ Joint Institute for Nuclear Research

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

² National University of Mongolia

University str., 1, Ulaanbaatar, 210646, Mongolia

Abstract. In this work, we simulated the passage of charged particle tracks through various regions of the hippocampus of rats, which included the main cell types of various morphology. For each model of the neuron we modeled a cellular body (soma) with nuclear DNA, axon and dendrites, with spines and synaptic receptors distributed on them. With the use of the Geant4 Monte-Carlo method we simulated the physicochemical processes in the hippocampal neurons and the neural networks formed by them under irradiation with charged particles in a wide range of linear energy transfer (LET). The calculation of the formation of molecular damage of various types in the sensitive structures of nerve cells taking into account the processes of water radiolysis after radiation exposure was also carried out. It is predicted that the yield of cluster single-stranded DNA breaks, including base damage, has maximum at LET values in the range of 20-50 keV/μm. The maximum yield of double-stranded DNA breaks per unit of absorbed dose is observed at LET values within 100-200 keV/μm, and the largest yield of cluster double-stranded DNA breaks, including base damage, occurs in the area of LET around 300 keV/μm. The results obtained are in agreement with the published experimental data.

Key words: neurons, charged particle track, clustered DNA damage, RBE.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ И МЕХАНИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА В СДВИГОВОМ ПОТОКЕ ВЯЗКОЙ ЖИДКОСТИ

Кущенко Ю.К., Беляев А.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, д.1, г. Москва, 199991, РФ; e-mail: al_belyaev@inbox.ru
Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. На начальной стадии гемостаза или тромбоза тромбоциты крови прикрепляются к месту повреждению и иммобилизируются на поверхности сосудов. Эта начальная агрегация тромбоцитов обеспечивает основу для дальнейших биохимических реакций, упрочнения тромба и остановки кровотечения. Поэтому детальное изучение первых стадий адгезии и агрегации тромбоцитов представляет собой актуальную задачу. Механизм первичной адгезии тромбоцитов в артериальных условиях, основан, главным образом, на специфическом взаимодействии «ключ-замок» между трансмембранным гликопротеином GPIb на поверхности тромбоцитов и белком плазмы крови – фактором фон Виллебранда (ФВ), – который обеспечивает адгезию тромбоцитов к травме в артериях и микрососудах. В настоящей работе представлена трехмерная компьютерная модель, которая позволяет явно описывать динамику, конформационные изменения и активацию ФВ гидродинамическими силами. Модель основана на сочетании метода решеточных уравнений Больцмана с флуктуациями для моделирования гидродинамики и крупно-зернистой модели динамики частиц для описания динамики полимерной цепочки в вязкой жидкости. Модель была верифицирована путем сравнения результатов расчетов с экспериментальными данными, найденными в литературе. Численные результаты показывают, что контурная длина мультимера ключевым параметром, регулирующим тромбогенность ФВ в крови. Также модель показала, что прикрепление к поверхности способствует активации ФВ и адгезии тромбоцитов. Полученные результаты могут быть использованы при многомасштабном компьютерном моделировании роста тромба в кровеносных сосудах.

Ключевые слова: фактор фон Виллебранда, тромбоз, гемостаз, гидродинамическая активация, механохимическая регуляция, компьютерное моделирование.

Фактор фон Виллебранда (ФВ) – крупнейший белок плазмы крови, участвующий в регуляции первичной адгезии тромбоцитов при артериальном и микрососудистом гемостазе [1]. При больших вязких сдвиговых напряжениях, наблюдаемых в артериолах, венах и артериях, процесс тромбобразования определяется агрегацией тромбоцитов и инициируется благодаря прикреплению (адгезии) тромбоцитов крови к обнаженному субэндотелию, основу которого составляет коллаген. На первичной стадии гемостатических и тромботических процессов тромбоциты прикрепляются к фактору Виллебранда и иммобилизируются на поверхности сосудов [2, 3]. Эта начальная агрегация тромбоцитов обеспечивает основу для дальнейших биохимических реакций, упрочнения тромба и остановки кровотечения. Тромбоциты активируются после первоначального прикрепления, что обеспечивает их необратимую адгезию к коллагену и формирует своеобразный фундамент для прикрепления новых тромбоцитов и роста тромбоцитарного агрегата. Таким образом, иммобилизация первого слоя тромбоцитов в месте повреждения является ключевым этапом артериального и микрососудистого гемостаза.

Механизм первичной адгезии тромбоцитов в артериальных условиях, основан, главным образом, на специфическом взаимодействии трансмембранного гликопротеина GPIb на поверхности тромбоцитов и белка плазмы крови фактора фон Виллебранда. Димеры фактора фон Виллебранда массой около 500 кДа за счет дисульфидных связей сшиваются в линейные цепочки (мультимеры) длиной в десятки димеров [1]. Такие конструкции, называемые конкатамерами или мультимерами, оказываются чувствительными к локальным сдвиговым напряжениям в жидкости и способны изменять свою конформацию под действием гидродинамических сил. Ранние экспериментальные исследования показали, что физиологическая активность ФВ имеет пороговый характер. При нормальных скоростях сдвига (<5000 /с) в плазме конформация мультимера ФВ соответствует плотной глобуле, в то время как при более высоких (патологических) скоростях сдвига (>5000 /с) мультимеры ФВ вытягиваются и приобретают нитевидную конформацию, благоприятную для прикрепления тромбоцитов [4]. Недавние исследования показали, что, с механической точки зрения, определяющим фактором является не кинематическая величина – пристеночная скорость сдвига $\dot{\gamma} = du_x/dz$, – а величина вязких сдвиговых напряжений в плазме крови $\Sigma = \mu \dot{\gamma}$, где μ – динамическая вязкость [5]. Можно предположить, что ФВ практически не прикрепляется к тромбоцитам при нормальных гемодинамических условиях, в противном случае это бы приводило к патологическим состояниям: системному тромбозу и закупорке кровеносных сосудов. Таким образом, необходимым условием связывания ФВ с рецепторами тромбоцита является его механическая активация гидродинамическими силами.

Механизмы чувствительности ФВ к гидродинамическому потоку, по всей видимости, обусловлены его иерархической молекулярной структурой. Каждый димер ФВ состоит из нескольких доменов, при этом каждый

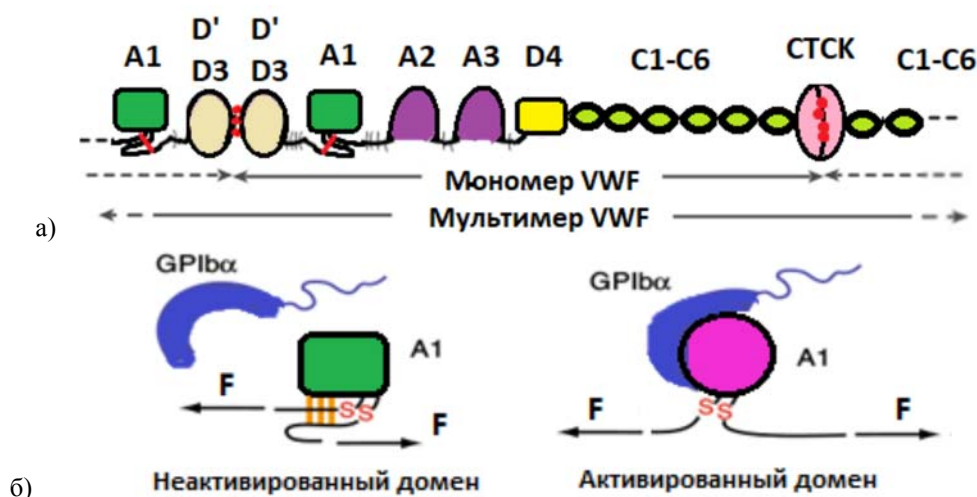


Рисунок 1. Доменная структура димера фактора фон Виллебранда (а) и предполагаемый механизм активации домена A1 механическим натяжением (б)

домен выполняет одну или несколько функций (рис. 1а). Ключевыми для регуляции первичного гемостаза и тромбоза являются домены А. Домен А1 способен при активации связываться с гликопротеином Ib тромбоцитов, тем самым обеспечивать прикрепление тромбоцитов к месту повреждения их качение и адгезию. Соседний домен А2 содержит протеолитический сайт для металлопротеиназы ADAMTS-13. Посредством этого фермента регулируется длина молекулы ФВ. Домен А3 служит для прикрепления к субэндотелиальному с коллагену. Цистеиновый узел, расположенный на С-конце белка обеспечивает поддержание димерной структуры ФВ, связывая два мономера в димер [1, 5]. В силу близкого расположения друг к другу, некоторые домены ФВ могут влиять на структуру и свойства соседних доменов, осуществляя регуляцию работы белка на молекулярном уровне. Так, согласно литературным данным [6], активация VWF связана с соответствующим пространственным расположением доменов А1 и А2. При отсутствии каких-либо внешних сил воздействующих на субъединицу ФВ, домен А2 блокирует часть поверхности домена А1, тем самым мешая ему взаимодействовать с рецептором тромбоцитов GPIIb. Кроме того, по данным работы [5], к локальному изменению конформации белка также приводят водородные связи между участками домена А1 и цепочками-линкерами, соединяющими его с соседними доменами. Этот аутоингибирующий механизм предотвращает чрезмерное связывание ФВ с тромбоцитами при малых значениях сдвиговых скоростей, когда агрегация тромбоцитов не требуется. Если субъединица ФВ растягивается (например, потоком жидкости), область вокруг домена А1 изменяет конформацию, домены А1 и А2 разделяются, и домен А1 оказывается доступным для связывания с рецепторами тромбоцита (рис. 1б).

Таким образом, биохимическая активность ФВ обуславливается рядом конформационных изменений, связанных с локальными механическими (точнее – гидродинамическими) характеристиками жидкой среды, окружающей белок. Мультимеры ФВ претерпевают ряд структурных изменений при изменении интенсивности кровотока. До сих пор нет единого понимания, в какой мере описанные выше процессы влияют на способность ФВ прикреплять тромбоциты к месту повреждения сосуда.

С целью достичь более детального понимания механизмов гидродинамической активации ФВ и получить численные данные о пороговых значениях гидродинамических параметров авторами настоящей статьи была разработана и верифицирована трехмерная компьютерная модель, описывающая динамику мультимера ФВ в вязкой жидкости.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

В настоящей работе использована крупно-зернистая модель полимера (рис. 2). В качестве метода расчетов используется комбинация метода решеточных уравнений Больцмана (LB) [7] с методом лагранжевой динамики частиц (LPD) [8].

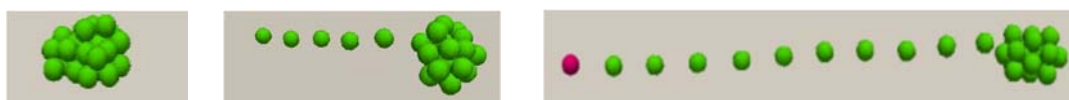


Рисунок 2. Стоп-кадры компьютерного моделирования в последовательные моменты времени (поток жидкости направлен слева направо, градиент скорости направлен из рисунка), активированный мономер обозначен фиолетовым цветом

Мультимер ФВ представлен как свободно-сопряженная полимерная цепочка, состоящая из сферических субъединиц радиусом a , соединенных упругими элементами. Для описания упругих (ковалентных) связей между субъединицами используется потенциал следующего вида:

$$U_{FENE}(r) = -0.5 K (\Delta r_{max})^2 \ln \left[1 - \left(\frac{r-r_0}{\Delta r_{max}} \right)^2 \right], \quad (1)$$

где K – коэффициент жесткости; Δr_{max} – максимальное растяжение; $r_0 = 2a$ – равновесная длина упругого элемента. Из экспериментальных данных по растяжению димера ФВ с помощью атомно-силового микроскопа [9] были найдены значения $K = 0.06$ нН/мкм и $\Delta r_{max} = 300$ нм.

Гидрофобные взаимодействия, благодаря которым ФВ принимает компактную конформацию в отсутствие гидродинамического потока, учтены в модели неявным образом. Для этого был использован потенциал Леннарда-Джонса:

$$U_{LJ}(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (2)$$

где r – расстояние между центрами частиц; ε – глубина потенциальной ямы; а параметр σ – расстояние, на котором энергия взаимодействия становится равной нулю, – подобран так, чтобы положение равновесия соответствовало расстоянию между центрами двух контактирующих шариков $r_0 = 2a$. Потенциал (2) обрезался на расстоянии $3a$ и сдвигался так, чтобы значение в точке обрезки равнялось 0. Амплитуда «гидрофобного» взаимодействия ε варьировалась в ходе нашего исследования, чтобы определить наиболее реалистичное значение этого параметра. Из сравнения с экспериментами [5] было установлено, что $\varepsilon = 4$ кТ дает вполне реалистичные численные результаты.

Критерием активации субъединиц фактора фон Виллебранда в нашей модели является критическое значение удлинения пружины, соединяющей димеры. Таким образом, если расстояние между димерами превышает 0,2 мкм, они считаются активированными.

Метод решеточных уравнений Больцмана (LB) является быстрым, точным, легко масштабируемым методом расчета динамики жидкости при малых числах Рейнольдса ($Re < 1$). Этот подход в настоящее время широко используется в вычислительной гемодинамике [10]. Метод основан на кинетическом уравнении Больцмана, которое описывает пространственно-временные изменения одночастичной функции распределения частиц по скоростям и координатам $f(\mathbf{x}, \mathbf{u}, t)$, определенной в 6-мерном фазовом пространстве:

$$\frac{\partial f}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \frac{\partial f}{\partial \mathbf{x}} + \frac{\mathbf{F}}{m} \cdot \frac{\partial f}{\partial \mathbf{u}} = \Omega, \quad (3)$$

где $\Omega(\mathbf{x}, \mathbf{u}, t)$ – интеграл столкновений; $\mathbf{F}$ – внешняя сила. При дискретизации в скоростном и координатном пространстве жидкость представляется как пакеты частиц, движущихся от одного узла к соседнему узлу трехмерной периодической кубической сетки $\{\mathbf{x}\}$ в 19 возможных направлениях $\{\mathbf{c}_i\}$ (использована схема дискретизации D3Q19). Дискретная функция распределения $f_i(\mathbf{x}, t)$ подчиняется следующему уравнению:

$$f_i(\mathbf{x} + \mathbf{c}_i \Delta t, t + \Delta t) = f_i(\mathbf{x}, t) + \Omega_i(\mathbf{x}, t) + \chi_i \quad (4)$$

где

$$f_i(\mathbf{x}, t) \equiv f(\mathbf{x}, \mathbf{c}_i, t) \quad (5)$$

$$\Omega_i(\mathbf{x}, t) = -[f_i(\mathbf{x}, t) - f_i^{eq}(\mathbf{x}, t)]/\tau \quad (6)$$

$$\mathbf{c}_i = c \times \begin{cases} (0,0,0) & i = 0 \\ (\pm 1, 0, 0), (0, \pm 1, 0), (0, 0, \pm 1) & i = 1, 2, \dots, 6 \\ (\pm 1, \pm 1, 0), (0, \pm 1, \pm 1), (\pm 1, 0, \pm 1) & i = 7, 8, \dots, 18, \end{cases} \quad (7)$$

где c – единица измерения скорости (решеточная скорость звука); τ – характерное время релаксации, определяющее кинематическую вязкость жидкости; χ_i – случайная величина, учитывающая тепловые флуктуации, амплитуда которых определяется флуктуационно-диссипативной теоремой [11]; а $f_i^{eq}(\mathbf{x}, t)$ – равновесная функция распределения, определяемая законом Максвелла-Больцмана. Решение уравнения (4) относительно $f_i(\mathbf{x}, t)$ позволяет найти плотность жидкости и гидродинамическую скорость следующим образом:

$$\rho = \sum_i f_i, \quad \mathbf{u}_j = \frac{1}{\rho} \sum_i f_i \mathbf{c}_i \quad (8)$$

В качестве граничных условий предполагалось отсутствие гидродинамического скольжения на твердой стенке при $z = 0$ и условие постоянной скорости жидкости $\mathbf{u} = \mathbf{u}_{top}$ при $z = b_z$. На остальных границах расчетной области предполагались периодические граничные условия.

Для связи между полимерной цепочкой и жидкостью в модель лагранжевой динамики частиц была добавлена сила вязкого трения, пропорциональная скорости движения частиц полимера относительно жидкости

$$\mathbf{F}_{тр} = -\xi(\mathbf{V}_п - \mathbf{u}_ж), \quad (9)$$

при этом сила противоположного направления локально сообщалась жидкости.

В рамках представленной модели исследована динамика фактора фон Виллебранда в сдвиговом потоке жидкости (течение Куэтта). Были рассмотрены две конфигурации: 1) цепочка, закрепленная на плоской непроницаемой стенке; 2) свободно взвешенная в жидкости цепочка. Размеры модельной системы составляли $8 \times 8 \times 16$ микрометров. Все параметры и физические значения в модели были нормированы в соответствии с определенной системой единиц: $[L] = 10^{-6}$ м, $[F] = 10^{-9}$ Н, $[t] = 10^{-4}$ с.

Для калибровки модели использовались экспериментальные результаты из работы [5]. Мультимер ФВ был прикреплен одним концом к поверхности и погружен в буфер вязкой жидкости с динамической вязкостью $\mu = 58$ сП. Высокое значение вязкости позволяло получить те же значения сдвиговых напряжений при меньших скоростях жидкости, что позволяло увеличить шаг интегрирования при численных расчетах без вреда для устойчивости численной схемы. При этом полимерная цепочка вытягивалась вдоль вертикальной оси, и ей давалось время на принятие глобулярной конформации. Затем в системе было установлено сдвиговое течение Куэтта, и напряжение сдвига варьировалось от 0 до 1280 дин / см^2 . Моделирование динамики полимерной цепочки под действием гидродинамического потока происходило в течении 1000 мс физического времени, затем еще 1000 мс проводилось моделирование релаксации полимера в отсутствие сдвигового потока.

Одна из задач настоящей работы заключалась в определении коэффициента трения ξ и гидродинамического радиуса r_h димера ФВ. Согласно закону Стокса, $\xi = 6\pi\mu r_h$. При вязкости модельной жидкости $\mu = 58$ сП мы определили, что совпадение с экспериментальными данными, найденными в литературе, достигается, если коэффициент трения $\xi = 10$ нН·с/м (или $0,1$ в безразмерных единицах). Рассчитанное значение гидродинамического радиуса субъединицы ФВ составляет $r_h \approx 11 - 13$ нм. Отметим, что вязкость реальной плазмы крови в 20 раз меньше, а в силу линейности закона Стокса при расчетах в физиологическом диапазоне вязкости величина коэффициента трения ξ должна быть уменьшена в соответствующее число раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Была проведена серия расчетов для разных длин полимерной цепи от $N = 10$ до 50 мономеров. Длины этих цепочек соответствуют контурной длине цепочки $2aN$ в диапазоне от 1 до 5 мкм, что является типичным значением для здорового ФВ, циркулирующего в крови.

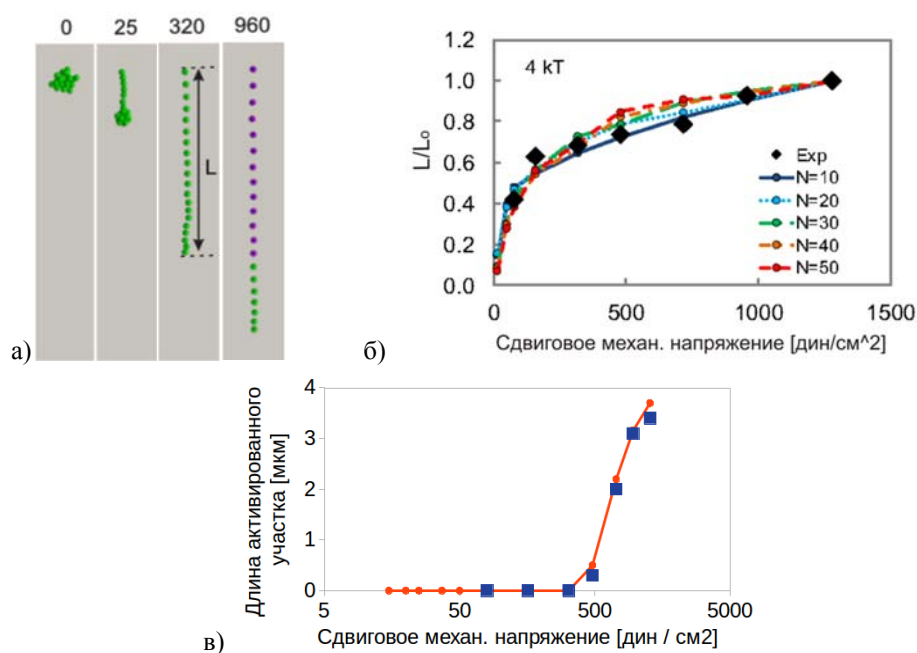


Рисунок 3. (а) Равновесная конформация мультимера ФВ, прикрепленного за один конец к твердой стенке, в потоке Куэтта в модельных расчетах при различных сдвиговых напряжениях (цифры соответствуют дин/см²); фиолетовым обозначены активированные субъединицы. Сравнение расчетов с экспериментальными данными по удлинению (б) и активации (в) мультимера из работы [5]

На рисунке 3 представлены результаты моделирования для закрепленной полимерной цепочки. Видно, что компьютерная модель хорошо описывает экспериментальные данные. При отсутствии потока структура остается глобулярной. С увеличением потока происходит разворачивание глобулы и удлинение полимера. При сдвиговых напряжениях > 500 дин/см² происходит активация мономеров.

Также были построены зависимости длины мультимера от времени при релаксации в глобулярное состояние растянутого мультимера после отключения гидродинамического потока (рис. 4). Результаты показывают, что независимо от длины полимера релаксация происходит по экспоненциальному закону, однако короткие цепочки релаксируют быстрее. Также было получено неплохое сходство с экспериментом.

В ходе работы было подсчитано количество активировавшихся мономеров фактора фон Виллебранда при различных значениях тангенциального механического напряжения, вызванного вязким трением в присутствии сдвигового потока жидкости. Согласно полученным численным результатам (рис. 5а), более длинные мультимеры ФВ активируются при меньших сдвиговых напряжениях. Графики зависимости активации от величины сдвигового потока наглядно демонстрируют, что более длинные мультимеры более восприимчивы к гидродинамическим условиям, чем более короткие. Это подразумевает вывод о том, что более длинные цепи ФВ являются более тромбогенными, чем короткие при одинаковых сдвиговых напряжениях. В рамках нашей модели число активированных мономеров для свободного фактора фон Виллебранда оказалось на порядок меньше, чем для привязанного при тех же гидродинамических условиях (рис. 5б). Кроме того, критические сдвиговые напряжения, при которых начинает активироваться свободный фактор Виллебранда существенно выше, чем сдвиговые напряжения, активирующие прикрепленный полимер.

Полученные результаты могут быть использованы при многомасштабном компьютерном моделировании роста тромба в кровеносных сосудах. Модель хорошо откалибрована и применима для изучения конформации фактора Виллебранда в различных гидродинамических условиях *in vivo* и *in vitro*. Результаты работы позволили уточнить механизм первичного гемостаза. Ранее считалось, что активация фактора Виллебранда связана только с его разворачиванием (переходом из глобулярного состояния в нитевидное). В настоящей работе показано, что механо-химическая активация мультимеров ФВ – многостадийный процесс: сначала происходит закрепление

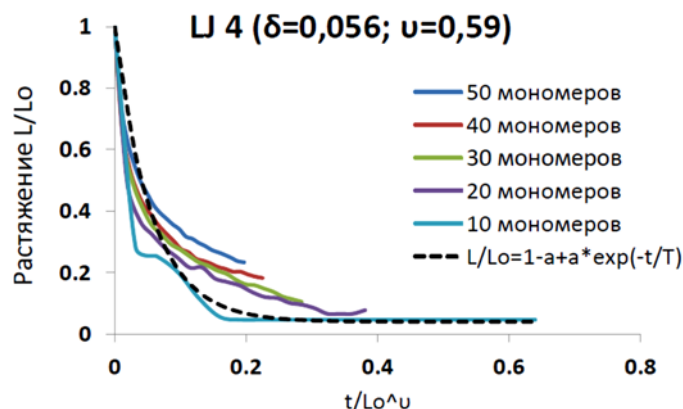


Рисунок 4. Релаксация полимерных цепочек при отключении сдвигового потока. L_0 – максимальная фактическая длина полимера, наблюдаемая в расчетах. Черный пунктир соответствует регрессии экспериментальных данных из работы [5]

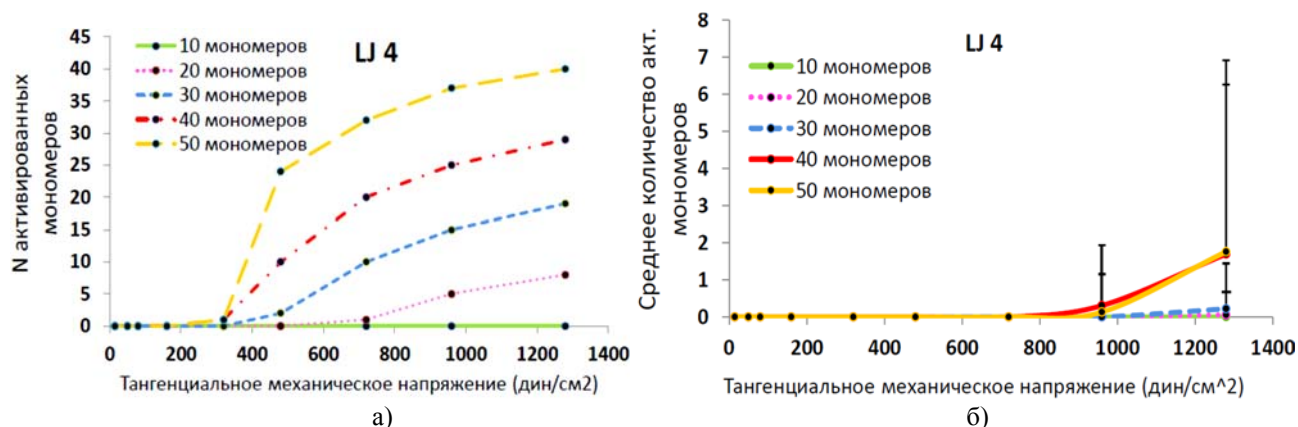


Рисунок 5. Зависимость количества активированных мономеров прикрепленного (а) свободно взвешенного в жидкости (б) мультимера ФВ от величины вязкого сдвигового напряжения. Для рассмотрения были взяты усредненные по времени значения. Планки погрешностей на панели (б) соответствуют среднеквадратичному отклонению при усреднении по времени. Погрешность на панели (а) соответствует размеру символа

ФВ на ране (субэндотелиальном коллагене), затем развертывание глобулы в нитевидную конформацию, и только после этого происходит растяжение димеров и активация их способности улавливать тромбоциты. Последний этап достигается только, если пристеночные сдвиговые напряжения больше порогового значения 480 дин /см². Активация мультимера ФВ, прикрепленного к стенке сосуда (или проточной камеры) наступает при меньших скоростях, чем для свободно взвешенного в плазме крови мультимера ФВ. Этот механизм, в свою очередь, предохраняет организм от нежелательного срабатывания агрегации тромбоцитов в русле неповрежденного сосуда.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 19-31-70002-мол_а_мос; № 19-02-00480-а). Расчеты проводились на суперкомпьютерном комплексе НИИЦ МГУ (СК «Ломоносов-2» и «Ломоносов»).

Список литературы / References:

1. Springer T. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood*, vol. 124, pp. 1412-1425.
2. Maxwell M.J., Westein E., Nesbitt W.S., Giuliano S., Dopheide S.M., Jackson S.P. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood*, 2007, vol. 109, pp. 566-576.
3. Jackson S.P., Nesbitt W.S., Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2009, vol. 7, no. 1, pp. 17-20.
4. Schneider S.W., Nuschele S., Wixforth A., Gorzelanny C., Alexander-Katz A., Netz R.R., Schneider M.F. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2007, vol. 104, pp. 7899-7903.
5. Fu H., Jiang Y., Yang D., Scheiflinger F., Wong W.P., Springer T.A. Flow-induced elongation of von Willebrand factor precedes tension-dependent activation. *Nature Communications*, 2017, vol. 8, p. 324. DOI: 10.1038/s41467-017-00230-2.
6. Aponte-Santamaria C., Huck V., Posch S., Bronowska A.K., Grassle S., Brehm M.A., Obser T., Schneppenheim R., Hinterdorfer P., Schneider S.W., Baldauf C., Gräter F. Force-sensitive autoinhibition of the von Willebrand factor is mediated by interdomain interactions. *Biophysical Journal*, 2015, vol. 108, pp. 2312-2321.
7. Succi S. *The Lattice Boltzmann Equation for Fluid Dynamics and Beyond (Numerical Mathematics and Scientific Computation)*. Oxford University Press, USA, 2001
8. Dunweg B., Ladd A.J.C. Lattice Boltzmann simulations of soft matter systems, in: *Adv. in Polymer Sci.*, Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp.1-78.
9. Müller J.P., Mielke S., Löf A., Obser T., Beer C., Bruetzel L.K., Pippig D.A., Vanderlinden W., Lipfert J., Schneppenheim R., Benoit M. Force sensing by the vascular protein von Willebrand factor is tuned by a strong intermonomer interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, vol. 113, no. 5, pp. 1208-1213. DOI: 10.1073/pnas.1516214113.
10. Mountrakis L., Lorenz E., Malaspinas O., Alwayyed S., Chopard B., Hoekstra A.G. Parallel performance of an IB-LBM suspension simulation framework. *Journal of Computational Science*, 2015, vol. 9, pp. 45-50.
11. Adhikari R., Stratford K., Cates M.E., Wagner A.J. Fluctuating lattice Boltzmann. *Europhys. Lett.*, 2005, vol. 71, pp. 473-479. DOI: 10.1209/epl/i2004-10542-5.

CONFORMATION CHANGE AND MECHANICAL ACTIVATION OF VON WILLEBRAND FACTOR PROTEIN IN A SHEAR FLOW OF VISCOUS FLUID STUDIED BY COMPUTER SIMULATIONS

Kushchenko Yu.K., Belyaev A.V.

Lomonosov Moscow State University

Leninskiye gory, 33, Moscow, 119991, Russia; e-mail: al_belyaev@inbox.ru

Abstract. At the initial stage of hemostasis or thrombosis, blood platelets attach to the injury and become immobilized on vascular surface. This initial platelet aggregation provides the basis for biochemical reactions, hardening of the blood clot and cessation of bleeding. Therefore, a detailed study of the first stages of adhesion and platelet aggregation is an urgent task. The mechanism of primary platelet adhesion in arterial hydrodynamic conditions is based mainly on the specific key-lock interactions between the transmembrane platelet glycoprotein GPIb and the plasma protein von Willebrand factor. The von Willebrand factor (VWF) is a multimeric plasma protein that provides platelet adhesion to injury in the arteries and microvessels. This paper presents a three-dimensional computer model that allows one to explicitly describe the dynamics, conformational changes, and activation of VWF by hydrodynamic forces. The model is based on the combination of the Boltzmann lattice method with fluctuations to simulate hydrodynamics and a coarse-grained particle dynamics model for describing the dynamics of a polymer chain in a viscous fluid. The model was verified by comparing the results of calculations with experimental data found in the literature. Numerical results show that the contour length of the multimer is an important parameter regulating the thrombogenicity of VWF in the blood. The model also showed that attachment to the surface contributes to the activation of VWF and platelet adhesion. The results can be used in a multiscale computer simulation of the growth of blood clots in blood vessels.

Key words: von Willebrand factor, thrombosis, hemostasis, hydrodynamic activation, mechano-chemical regulation, computer simulations.

АДАПТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА РЕСВЕРАТРОЛА

Жигачева И.В.¹, Крикунова Н.И.¹, Русина И.Ф.², Расулов М.М.³¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 11933, РФ; e-mail: zhigacheva@mail.ru

² ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: rusina939@mail.ru

³ Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, ш. Энтузиастов, 38, г. Москва, 105118, РФ; e-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Поступила в редакцию: 19.07.2019

Аннотация. Исследована биологическая и антирадикальная активность природного полифенола – ресвератрола. (РВ). Хемилюминесцентным методом показаны высокие значения антирадикальной активности этого препарата. При этом на модельной системе «старения» митохондрий (инкубация митохондрий в гипотонической инкубационной среде) продемонстрировано, что препарат в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-14} М предотвращал активацию ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс и митохондрий проростков гороха, что, вероятно, свидетельствовало о наличии у РВ антистрессовых свойств. Протекторные свойства препарата исследовали, используя модель острой гипобарической гипоксии (ОГГ) для крыс и модель дефицита воды для проростков гороха. ОГГ приводила к 1,5-3-кратному росту интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий. Активация ПОЛ сопровождалась изменениями в жирнокислотном (ЖК) составе общей липидной фракции мембран митохондрий. Коэффициент ненасыщенности C_{18} ЖК снижался на 15%, а содержание ЖК с очень длинной цепью (ЖКОДЦ): 22:4 ω 6 и 22:5 ω 3 снижалось почти на 28%. Введение животного $2,2 \times 10^{-5}$ М ресвератрола в течение 5 дней предотвращало изменения жирнокислотного состава митохондрий и активацию ПОЛ, что влияло на физиологические показатели. Ресвератрол в 2,0-2,5 раза увеличивал продолжительность жизни и на 10-15% повышал выживаемость мышей при различных видах гипоксии. Кроме того, препарат предотвращал торможение роста проростков гороха в условиях дефицита воды. Делается предположение, что адаптогенные свойства препарата обусловлены его антиоксидантной и антирадикальной активностью.

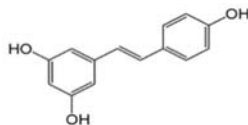
Ключевые слова: ресвератрол, ПОЛ, митохондрии, жирнокислотный состав мембран, острая гипобарическая гипоксия, дефицит воды.

Ресвератрол (3,5,4'-тригидрокси-транс-стильбен) представляет собой полифенольное соединение со структурой стильбена. Его находят в растениях, таких как арахис, виноград и некоторые ягоды [1]. Содержание ресвератрола в растениях варьирует и увеличивается в ответ на биотические и абиотические стрессы [2]. Он рассматривается как антиоксидант и противовоспалительное средство [3, 4]. Кроме того, ресвератрол предотвращает возрастные заболевания, рак кожи и осуществляет защиту от сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6]. Препарат оказывает нейрозащитное действие при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, а также может защитить мозг от повреждения, вызванного токсинами и травмами [7].

Его протекторные свойства, возможно, объясняются активацией гистоновых и белковых деацетилаз: лизин деацетилазы и сиртуин1 (SIRT1) [5]. При этом, ресвератрол является активатором сигнального пути Notch [8], регулирующего миграцию клеток – предшественников костного мозга, стимулирующего пролиферацию кардиомиоцитов и, активность прогениторных клеток сердца [9].

Основная мишень для ресвератрола - митохондрии, играющие одну из основных ролей в энергетическом метаболизме клетки. По мнению Naïg Gueguen с соавторами [10] действие препарата направлено на комплекс I дыхательной цепи митохондрий. Используя солиubilизированный комплекс I, авторы продемонстрировали конкуренцию между НАД⁺ и ресвератролом. В низких дозах (<5 мкМ) ресвератрол стимулировал активность комплекса I, тогда как в высоких дозах (50 мкМ) он снижал его активность. Препарат способен осуществлять защиту от окислительного стресса *in vitro* и *in vivo*. Он предотвращая высвобождение цитохрома c и снижая генерацию супероксидного анион радикала путем экспрессии гена *SOD 2* (митохондриальной Mn-SOD), либо активируя разобщающий белок UCP2 в мембранах митохондрий [11]. В высоких концентрациях препарат вызывал нарушение окислительно-восстановительного статуса клетки, увеличение генерации АФК митохондриями, а также открытие митохондриальной неспецифической поры (mPTP), что вело к снижению жизнеспособности клеток [12]. Механизм, с помощью которого ресвератрол влияет на функциональное состояние митохондрий до конца не изучен, и в связи с этим довольно актуальна проблема исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе протекторного действия ресвератрола на структуру и функции митохондрий.

Целью нашего исследования было изучение антирадикальной и биологической активности ресвератрола:



Ресвератрол

Работу проводили на митохондриях печени крыс, подверженных стрессовому воздействию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на крысах линии Wistar, весом 150-170 г. Поскольку препарат обладает низкой биодоступностью, антистрессовые свойства ресвератрола частично исследовали на 5-дневных этиолированных проростках гороха (*Pisum sativum* L), сорт Флора 2, которые обрабатывали водными растворами препарата. Это обеспечивало его поступление к клеткам зародыша и эндосперма.

Регулирующие стандарты.

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [12], Strasburg, 1986, согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [13].

Крысам опытной группы (РВ) в/брюшинно вводили 2×10^{-5} М раствор ресвератрола в течение 5 дней.

Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян в течение 30 мин. замачивали в воде, а опытную группу – в 2×10^{-5} М растворе препарата (РВ). Затем все семена переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение суток. После этого половину проростков контрольной группы (ДВ) и проростки, обработанные РВ, на 2 суток переносили на сухую фильтровальную бумагу. Спустя 2 суток все проростки переносили на влажную фильтровальную бумагу, где они оставались в течение последующих 2 суток. Вторая половина семян контрольной группы оставалась на влажной фильтровальной бумаге в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков всех исследуемых групп.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [15]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 минут, второе – при 9000 g, 10 минут. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:0.25. Среда выделения: 0,25 М сахароза, 10 мМ HEPES, pH 7,4.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования [16]. Эпикотили гороха гомогенизировали в среде, содержащей: 0,4 М сахарозу, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 8,0), 10 мМ KCl, 2 мМ дитиотреитол и 0.1% бычий сывороточный альбумин (БСА), свободный от жирных кислот (ЖК). Гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 8 мл среды и центрифугировали при 3000 g в течение 3 мин. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4), 0,1% БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [17]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия). Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг. белка.

Антирадикальную активность (АРА) препарата оценивали хемилюминисцентным методом (ХЛ) по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола (RH), которое инициировали термическим распадом азобисизобутиронитрила АИБИН (60°). Интенсивность ХЛ усиливали 9,10-дибромантраценом. Эффективную константу $k_{\text{ин}}$ рассчитывали из серии ХЛ кривых с разной концентрацией ресвератрола (РВ) [18]. Полученные результаты соотносили с данными, полученными с использованием известного антиоксиданта дибунола.

Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [19, 20]. МЭЖК экстрагировали гексаном и полученные растворы анализировали.

Идентификацию МЭЖК проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) и по величинам индексов удерживания [21]. ГХМС осуществляли на хромато-масс-спектрометре Hewlett-Packard-6890 с масс-селективным детектором HP-5972. МЭЖК разделяли на капиллярной колонке HP-5MS (30 м $\times$ 0,25 мм, слой фазы 0,25 мкм) при программировании температуры от 60 до 285°C со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Температура испарителя – 250°C , детектора – 280°C . Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с/10 масс в области 40-450 а.е.м.

Определение количественного состава МЭЖК проводили на хроматографе марки Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (50 м × 0,32 мм, слой 0,25 мкм). Анализ МЭЖК проводили при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора – 270°C; скорость газа-носителя гелия составляла 2,0 мл / мин, деление потока на входе в колонку - 1:40. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали, как отношение площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическая обработка результата проводилась с использованием Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Острая гипобарическая гипоксия. В барокамере создавали разрежение, соответствующее высоте 9,0 тысяч метров над уровнем моря. «Подъем» проводили в первую минут до 5 тыс. м., а в каждую последующую еще на одну тысячу метров (Время нахождения крыс «на высоте» 9,0 тысяч метров над уровнем моря – 5,0 минут).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили путем определения средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $P \leq 0,05$.

В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол, хлороформ (Merck, Германия), сахароза, Трис, (Sigma, США), БСА (свободный от жирных кислот) (Sigma, США), NERES (MP Biomedicals, Германия), дитиотреитол (AppliChem), карбонат калия, метанол, хлороформ (Merck, Германия), гексан (Panreac, Испания), ацетилхлорид (Acros, Бельгия), Neres (4- (2-Гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота) (Biochemica Ultra, для молекулярной биологии) (MB Biomedicals, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в условиях стресса одним из основных источников активных форм кислорода являются митохондрии [22]. Поэтому для поиска концентраций ресвератрола (РВ), эффективно снижающих генерацию АФК митохондриями была разработана модель «старения» митохондрий. Модель заключалась в инкубации митохондрий в гипотонической среде в присутствии 1 мМ KH_2PO_4 , вызывающий слабое набухание митохондрий [23, 24]. «Старение» митохондрий проростков гороха и митохондрий печени крыс приводило к активации свободно радикального окисления, а, следовательно, и к активации ПОЛ в мембранах митохондрий. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха возрастала в 4 раза и в 3 раза в мембранах митохондрий печени крыс (рис. 1).

Введение РВ в среду инкубации митохондрий как растительного, так и животного происхождения снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и имело дозовую зависимость. В концентрации 10^{-4} М препарат не влиял на интенсивность ПОЛ в мембранах «стареющих» митохондрий, а в концентрации 10^{-3} М проявлял прооксидантный эффект. При этом РВ в концентрационном интервале от 10^{-5} - 10^{-14} М снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений. Можно предположить, что РВ обладает и антирадикальной активностью. Действительно, полученные значения константы ингибирования свободнорадикального окисления ($k_{\text{inh}} = 2,01\text{--}2,28 \times 10^4 \text{ Мс}^{-1}$) ресвератролом (РВ) и стехиометрического коэффициента ингибирования ($f = 1,9$) свидетельствуют о высокой антирадикальной активности препарата.

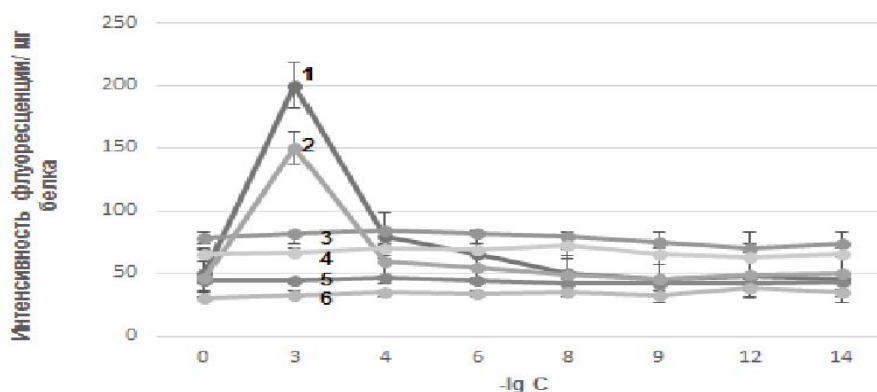


Рисунок 1. Интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс и митохондрий 5-дневных проростков гороха. Условные обозначения: 1 – «старение» митохондрий проростков гороха+ различные концентрации РВ; 2 – «старение» митохондрий печени крыс + различные концентрации РВ; 3 – «старение» митохондрий проростков гороха; 4 – «старение» митохондрий печени крыс; 5 – контроль (митохондрии проростков гороха); 6 – контроль (митохондрии печени крыс)

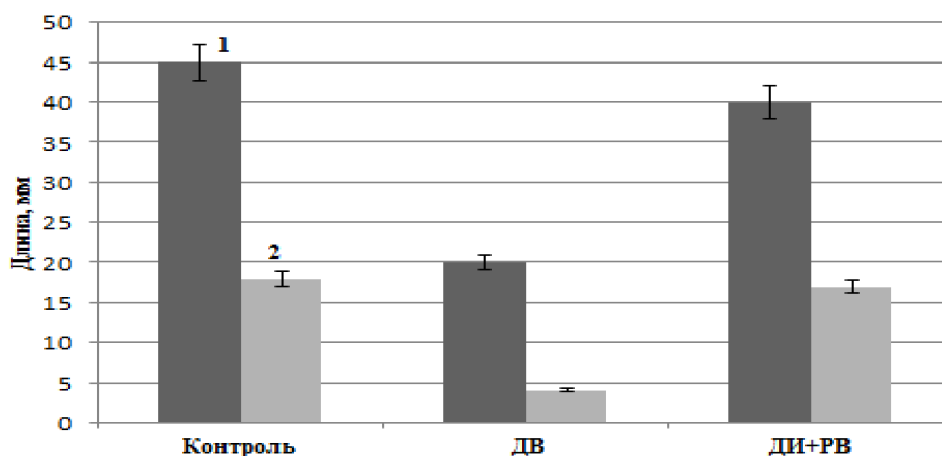


Рисунок 2. Влияние дефицита воды и ресвератрола на рост побегов (1) и корней (2) проростков гороха. Условные обозначения: ДВ – проростки гороха, находящиеся в условиях дефицита воды; РВ – проростки гороха, находящиеся в условиях дефицита воды и обрабатываемые 2×10^{-5} М раствором ресвератрола

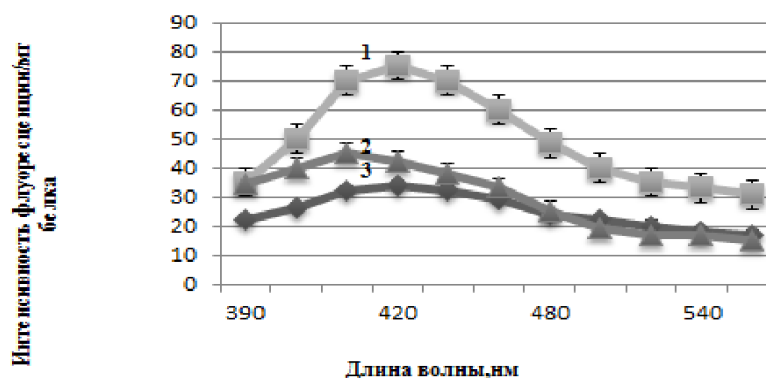


Рисунок 3. Влияние острой гипобарической гипоксии (ОГГ) и ресвератрола (РВ) на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. Условные обозначения: 1 – ОГГ; 2 – ОГГ + РВ; 3 – контроль

Наличие высокой антирадикальной и антиоксидантной активности у ресвератрола, вероятно, могло свидетельствовать о наличии у препарата антистрессовых свойств. Проверку на наличие этих свойств проводили используя модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ) для крыс и дефицита воды для проростков гороха.

Известно, что проростки гороха особенно чувствительны к дефициту воды [25]. В наших экспериментах мы использовали наиболее чувствительную к дефициту воды стадию роста проростков гороха (однодневных семян). Дефицит воды тормозил процессы роста проростков (рис. 2), что согласуется с данными литературы [26, 27]. Обработка семян гороха ресвератролом предупреждала это торможение, что подтверждало предположение о наличии у препарата антистрессовых свойств.

Дальнейшие исследования протекторных свойств ресвератрола проводили на крысах, которым в течение 5 дней вводили 2×10^{-5} М раствор ресвератрола и подвергали стрессовому воздействию. В качестве стрессового воздействия использовали модель острой гипобарической гипоксии (ОГГ). ОГГ сопровождалась к 1,5-3-кратным увеличением интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс (рис. 3).

Активация ПОЛ приводила к изменениям в жирнокислотном (ЖК) составе общей липидной фракции мембран митохондрий. Изменения наблюдались в содержании жирных кислот, содержащих 18 и 20 углеродных атомов. Так индекс ненасыщенности C_{18} ЖК снижался на 15% (рис. 4). Соотношение суммарного содержания C_{18} ненасыщенных ЖК к содержанию стеариновой кислоты снижалось с $1,69 \pm 0,10$ до $1,45 \pm 0,09$. При этом содержание 18:2 ω 6 уменьшалось на 8%, а содержание 18:1 ω 7 – на 28%. Снижение содержания линолевой кислоты – одной из основных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, обеспечивающего эффективную работу дыхательной цепи митохондрий, вероятно, приводило к снижению энергетического метаболизма клетки [28, 29]. Происходили изменения и в содержании C_{20} ЖК. Так содержание 22:5 ω 3 и 22:4 ω 6 снизилось на 28%. Учитывая, что эйкозаноиды являются сигнальными молекулами и имеют широкий спектр биологических функций, включая усиление или подавление воспалительных реакций, аллергии, лихорадки и других иммунных реакций; контроль артериального давления и секреции слизи и кислоты в желудке, сокращение или расслабление гладких мышц [30], снижение содержания этих ЖК, возможно, также, как и снижение содержания линолевой кислоты, влияло на устойчивость организма к стрессовым воздействиям.

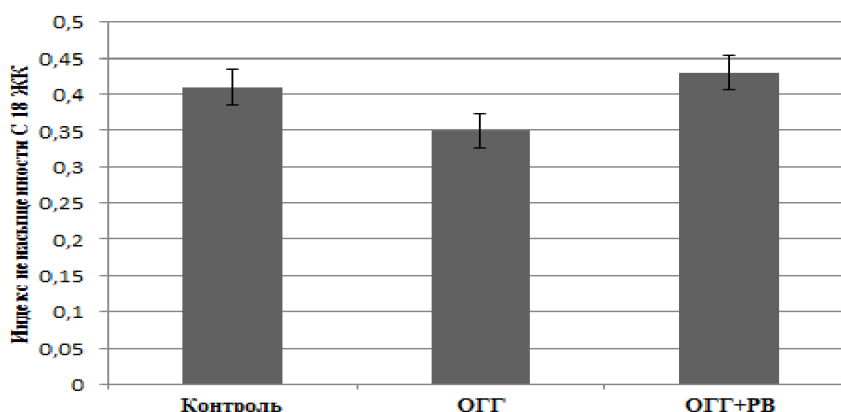


Рисунок 4. Влияние острой гипобарической гипоксии (ОГГ) и ресвератрола (РВ) на индекс ненасыщенности ЖК, содержащих 18 углеродных атомов

Введение животным РВ предотвращало активацию ПОЛ и изменения в жирнокислотном составе общей липидной фракции мембран митохондрий печени.

Изменение физико-химических свойств мембран митохондрий, по-видимому, оказывало влияние на функциональное состояние этих органелл, а, следовательно, и на энергетический метаболизм, что, возможно, отражалось на устойчивости организма к действию стрессовых факторов. Действительно, введение 2×10^{-5} М раствор ресвератрола в течение 5 дней в 2,0-2,5 раза увеличивала продолжительность жизни и на 10-15% повышала выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии (табл. 1).

Таблица 1. Протекторная активность ресвератрола (Представлены результаты 10 опытов)

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	Ресвератрол, 2×10^{-5} М
Подъем на высоту 11,5 тыс. м (гипобарическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	$4,0 \pm 1,1$ 20%	$8,0 \pm 1,2$ 30%
Инъекция азида натрия 20 мг/кг (цитотоксическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	$3,0 \pm 0,6$ 0%	$7,6 \pm 1,1$ 15%
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (гемическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	$13,1 \pm 2,5$ 20%	$32,5 \pm 3,0$ 36%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на полученных результатах, можно прийти к заключению, что адаптогенные свойства ресвератрола могут быть обусловлены его антиоксидантной и антирадикальной активностью. Снижение интенсивности процессов свободнорадикального окисления находит отражение в низкой интенсивности ПОЛ. Препарат, предотвращая пероксидацию фосфолипидов, главным образом кардиолипина, по-видимому, предупреждая диссоциацию суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий [31] и таким образом, вероятно, повышал устойчивость организма к действию стрессоров. Этому также способствовало сохранение пула эйкозаноидов в мембранах митохондрий [32].

Список литературы / References:

1. Diaz-Gerevini G.T., Repossi G., Dain A., Tarres M.C., Das U.N., Eynard A.R.. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition*, 2016, vol. 32, pp. 174-178. DOI: 10.1016/j.nut.2015.08.017.
2. Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no. 10, pp. 2731-2741. DOI: 10.1021/jf011429s.
3. Cucciolli V., Borriello A., Oliva A., Galletti P., Zappia V., Ragione F.D. Resveratrol: From basic science to the clinic. *Cell Cycle*, 2007, vol. 6, no. 20, pp. 2495-2510. DOI: 10.4161/cc.6.20.4815.
4. Shigematsu S., Ishida S., Hara M., Takahashi N., Yoshimatsu H., Sakata T. et al. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Med.*, 2003, vol. 34, pp. 810-817. PMID: 1265446.
5. Baur J.A., Sinclair D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, vol. 5, pp. 493-506.
6. Muhammad M.H., Allam M.M. Resveratrol and/or exercise training counteract aging-associated decline of physical endurance in aged mice; targeting mitochondrial biogenesis and function. *J. Physiol. Sci.*, 2018, vol. 68, no. 5, pp. 681-688. DOI: 10.1007/s12576-017-0582-4.

7. Saiko P., Szakmary A., Jaeger W., Szekeres T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.*, 2008, vol. 658, no. 1-2, pp. 68-94. DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.08.004
8. LaFoya B., Munroe J.A., Albig A.R. A comparison of resveratrol and other polyphenolic compounds on Notch activation and endothelial cell activity. *PLoS/One*, 2019, vol. 14, no. 1, p. e0210607. DOI: 10.1371/journal.pone.0210607.
9. Дергилев К.В., Зубкова Е.С., Белоглазова И.Б., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В. Сигнальный путь Notch – терапевтическая мишень для регуляции репаративных процессов в сердце. *Терапевтический архив*, 2018, № 12, с. 112-121. [Dergilev K.V., Zubkova E.S., Beloglazova I.B., Menshikov M.Yu., Parfenova E.V. Notch signaling pathway is a therapeutic target for the regulation of reparative processes in the heart. *Terapevticheskiy arkhiv*, 2018, no. 12, pp. 112-121. (In Russ.)]
10. Gueguen N., Desquiere-Dumas V., Leman G., Chupin St., Baron St., Nivet-Antoine V., Vessières E., Ayer A., Henrion D., Lenaers G., Reynier P., Procaccio V. Resveratrol Directly Binds to Mitochondrial Complex I and Increases Oxidative Stress in Brain Mitochondria of Aged Mice Increases. Oxidative Stress in Brain Mitochondria of Aged Mice. *PloS/One*, 2015, vol. 10, no.12, p. e0144290.
11. Moreira A.C., Silva A.M., Santos M.S., Sardão V. A Resveratrol affects differently rat liver and brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in vitro: Investigation of the role of gender. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, vol. 53, pp. 18-26. DOI: 10.1016/j.fct.2012.11.031.
12. Gadacha W., Ben-Attia M., Bonnefont-Rousselot D., Aouani E., Ghanem-Boughanmi N., Touitou Y. Resveratrol opposite effects on rat tissue lipoperoxidation: pro-oxidant during day-time and antioxidant at night. *Redox Rep.*, 2009, vol. 14, no. 4, pp. 154-158. DOI: 10.1179/135100009X466131.
13. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123)*, Strasbourg, 1986
14. Каркищенко Н.Н., Грачевой С.В. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. М: Профиль, 2010, 358 с. [Karkishchenko N.N., Gracheva S.V. *Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research*. М: Profil', 2010, 358 p. (In Russ.)]
15. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. Activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *BBA*, 1978, vol. 501, no. 3, pp. 415-423. DOI: 10.1016/0005-2728(78)90109-3.
16. Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. *Биохимия*, 2003, т. 686, № 7, с. 910-916 [Popov V.N., Ruge E.K., Starkov A.A. The effect of electron transport inhibitors on the formation of reactive oxygen species during the oxidation of succinate with pea mitochondria. *Biokhimiya*, 2003, vol. 686, no 7, pp. 910-916. DOI: 10.1023/A:1025078815819. (In Russ.)]
17. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of Fluorescent Lipid Peroxidation Products in Biological Systems and Tissues. *Ann. Biochem.*, 1973, vol. 52, no. 1, p. 1-9. DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-8.
18. Шляпинтох В.Я., Карпукhin О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. *Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов*. М: Наука, 1966, 300 с. [Shlyapintokh V.Ya., Karpukhin O.N., Postnikov L.M., Zakharov I.V., Vichutinsky A.A., Tsepalov V.F. *Chemiluminescent methods for the investigation of slow chemical processes*. М: Nauka. 1966, 300 p. (In Russ.)]
19. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of Macroscale Method to the Microscale for Fatty Acid Methyl Transesterification of Biological Lipid Extracts. *J. Chromatogr.*, 1979, vol. 151, no. 3, pp. 384-390. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9Get.
20. Wang J., Sunwoo H., Cherian G., Sim I.S. Fatty Acid Determination in Chicken Egg Yolk: a Comparison of Different Methods Poultry. *Sci.*, 2000, vol. 79, no. 8, pp. 1168-1171. DOI: 10.1093/ps/79.8.1168.
21. Golovina R.V., Kuzmenko T.E. Thermodynamic Evaluation Interaction of Fatty Acid Methyl Esters with Polar and Nonpolar Stationary Phases, Based on Their Retention Indices. *Chromatogr.*, 1977, vol. 10, no. 9, pp. 545-546. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02262915>.
22. Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Архангельская А.А., Хряпенкова Е.Г. Митохондрии как многоликий янус. *Биохимия*, 2007, т. 72, № 10, с. 1371-1384. [Zorov D.B., Isaev N.K., Plotnikov E.Yu., Zorova L.D., Stelmashuk E.V., Vasilyeva A.K., Arkhangelskaya A.A., Khryapenkova E.G. Mitochondria as a multifaceted Janus. *Biokhimiya*, 2007, vol. 72, no. 10, p. 1371-1384. (In Russ.)]
23. Aronis A., Komarnitsky R., Shilo Sh., Tirosh O. Membrane depolarization of isolated rat liver mitochondria attenuates permeability transition pore opening and oxidant production. *Antioxidant and redox signaling*, 2004, vol. 4, no. 4, p. 647-654. DOI: 10.1089/15230860260220157.
24. O'Rourke B. Mitochondrial Ion Channels. *Annual Review of Physiol.*, 2007, vol. 69, pp. 19-49. DOI: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.163804.
25. Генерозова И.П., Шугаев А.Г. Респираторный метаболизм митохондрий проростков гороха разного возраста в условиях дефицита воды. *Физиол. растений*, 2012, т. 596, № 2, с. 262-227. [Generozova I.P., Shugaev A.G. Respiratory metabolism of mitochondria of pea seedlings of different ages under conditions of water deficiency. *Fiziolyu rasteniy*, 2012, vol. 596, no. 2, pp. 262-227. (In Russ.)]
26. Koster K.L., Reisdorph N., Ramsau J.L. Changing Desiccation Tolerance of Pea Embryo Protoplasts during Germination. *J. Exp. Bot.*, 2003, vol. 54, pp. 1607-1614. DOI: 10.1093/jxb/erg17.
27. Okçu G., Kaya M.D., Atak M. Effects of Salt and Drought Stresses on Germination and Seedling Growth of Pea (*Pisum sativum* L.). *Turk. J. Agric. For.*, 2005, vol. 29, pp. 237-242.

28. Paradies G., Petrosillo G., Pistolesse M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Perfused Rat Heart. Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, 2004, vol. 94, no. 1, pp. 53-59. DOI: 10.1161/01.RES.0000109416.56608.64.
29. Acin-Perez R., Enriquez J.A. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1837, no. 4, pp. 444-450. DOI: 10.1016/j.bbabo.2013.12.009.
30. de Carvalho C.C.C.R., Caramujo M.J. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 10, pp. E 2583. DOI: 10.3390/molecules23102583.
31. Genova M.L., Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1837, no. 4, pp. 427-443. DOI: 10.1016/j.bbabo.2013.11.002.
32. Muller-Navarra D.C., Brett M.T., Park S., Chandra S., Ballantyne A.P., Zorita E., Goldman Ch.R. Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Nature*, 2004, vol. 427, no. 6969, pp. 69-72. DOI: 10.1038/nature02210.

ADAPTOGENIC PROPERTIES OF RESVERATROL

Zhigacheva I.V.¹, Krikunova N.I.¹, Rusina I.F.², Rasulov M.M.³

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences

st. Kosygin, 4, Moscow, 11933, Russia; e-mail: zhigacheva@mail.ru

² N.N. Semenov Institute of Chemical Physics Russian Academy of Sciences

st. Kosygin, 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: rusina939@mail.ru

³ State Scientific Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds

w. Enthusiasts, 38, Moscow, 105118, Russia; e-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Abstract. The biological and anti-radical activity of natural polyphenol – resveratrol (RV) was investigated. Chemiluminescent method showed high rates of antiradical activity of this drug. At the same time, on the model system of “aging” of mitochondria (incubation of mitochondria in the hypotonic incubation medium), it was shown that the drug in the concentration range of 10^{-5} – 10^{-14} M prevented the activation of LPO in the mitochondrial membranes of the rat liver and mitochondria of pea seedlings, which probably testified to the presence of anti-stress properties in RV. The protective properties of the drug were investigated using a model of acute hypobaric hypoxia (AHH) for rats and a model of water deficiency for pea seedlings. AHH resulted in a 1.5-3-fold increase in the fluorescence intensity of LPO products in mitochondrial membranes. The activation of lipid peroxidation was accompanied by changes in the fatty acid (FA) composition of the total lipid fraction of mitochondrial membranes. The unsaturation coefficient of C₁₈ FA decreased by 15%, and the content of FA with a very long chain (VLCFAs): 22: 4ω6 and 22: 5ω3 decreased by almost 28%. Introduction of 2.2×10^{-5} M resveratrol to animals within 5 days prevented changes in fatty acid composition of mitochondria and activation of LPO, which influenced physiological parameters. Resveratrol 2.0-2.5 times increased life expectancy and 10-15% increased the survival of mice in various types of hypoxia. In addition, the drug prevented inhibition of growth of pea seedlings in conditions of water scarcity. It is suggested that the adaptogenic properties of the drug are due to its antioxidant and antiradical activity.

Key words: resveratrol, POL, mitochondria, fatty acid composition of membranes, acute hypobaric hypoxia, water deficiency.

АКУСТИКО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СТРУКТУР ГЛАЗА ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*

Зак П.П.¹, Петронюк Ю.С.¹, Храмцова Е.А.¹, Трофимова Н.Н.¹, Мисяков А.Н.¹,
Гурьева Т.С.², Дадашева О.А.², Левин В.М.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119994, РФ; e-mail: pavelzak@mail.ru

² Институт медико-биологических проблем РАН
Хорошевское шоссе, 76А, г. Москва, 123007, РФ

Поступила в редакцию: 19.07.2019

Аннотация. В работе оценивались возможности сканирующих ультразвуковых акустических микроскопов ИБХФ РАН для исследования структур глаза мелких лабораторных животных. Объектом исследования служили цыплята мелкой домашней птицы: японский перепел *Coturnix japonica*. Диапазон размера глаз определялся возрастом птиц от 10-ти до 30-ти дневного возраста. Характеристики акустических микроскопов соответствовали размерам измеряемых глаз 5-10 мм в диаметре с погрешностью измерений до 15 мкм. Поточечное сканирование глаз по плоскости и глубине в условиях *in situ* обеспечивало компьютерную 3-х мерную визуализацию геометрии глаза в целом и основных структур его оптики. Были измерены размеры и форма глазного яблока, передней и задней камеры глаза, хрусталика, толщины роговицы, склеры и хорио-ретиального комплекса. Полученные данные открывают перспективу прижизненных неинвазивных измерений в исследованиях детской миопизации при моделировании на мелких лабораторных животных.

Ключевые слова: глаз, ультразвуковая микроскопия, возраст, японский перепел *Coturnix japonica*.

В настоящее время неинвазивные ультразвуковые исследования (УЗИ) глаз человека являются отработанным и успешным методом диагностической офтальмологии. Однако, стандартная офтальмологическая аппаратура малоприспособлена для экспериментальных медико-биологических исследований на глазах мелких лабораторных животных. ИБХФ РАН располагает ультразвуковыми сканирующими микроскопами собственной разработки, позволяющими работать с мелкими объектами. Основной задачей настоящей работы было оценить применимость сканирующего акустического микроскопа СИАМ-2018, разработанного в лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН [1, 2] для неинвазивного исследования структур глаза мелких лабораторных животных. В качестве удобного источника по получению глаз разного размера (диаметр 5-10 мм) были использованы разновозрастные цыплята японского перепела *Coturnix japonica* инкубационного разведения в виварии ИМБП РАН. Перспективным развитием выполненных измерений является моделирование процессов миопизации глаза в детском возрасте. Постнатальное развитие японского перепела происходит примерно в 50 раз быстрее, чем у человека. Так, для 10-30 дневных цыплят оказывается возможным исследовать закономерности формирования глаз в детском возрасте, а на птицах старше 9-ти месяцев исследовать старческие возрастные нарушения. В настоящее время такие работы ведутся в ИБХФ РАН в лаборатории физико-химических основ рецепции [3, 4]. Основные знания в этой области получены на тканевом и клеточном уровне методами гистологии, клеточной биологии и биохимии. Необходимой составляющей исследования миопических процессов является возможность визуализации оптики глаза в условиях *in situ* и *in vivo*. В соответствии с этим, нами выполнена настоящая методическая работа по исследованию разрешающей способности ультразвуковых акустических микроскопов собственной разработки на глазах цыплят и взрослых птиц *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Этические нормы по содержанию птиц и выведению их из эксперимента путем декапитации соответствовали требованиям «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Импульсная акустическая микроскопия основывается на применении зондирующих импульсов фокусированного высокочастотного ультразвука. Эхо-сигналы, отражаемые от фактических границ и внутренних элементов объекта исследования, регистрируются и подвергаются селекции по времени задержки. Визуализация структуры объекта происходит за счет механического сканирования зондирующего ультразвукового пучка, которое позволяет отображать амплитуду сигналов и, с ее помощью, визуализировать структуру объекта. В зависимости от задачи можно получить разные виды сканов изображений: С-скан – осуществляется послойно в глубину объекта; В-скан – формируется при помощи поперечных сечений; А-скан – представляет собой эхограмму в произвольно выбранной точке. Использование нескольких видов сканов в комплексе позволяет получить максимальную информацию об объекте при выборе данного метода исследования.

Для проведения исследования использовался сканирующий импульсный акустический микроскоп СИАМ-2018, разработанный в лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН. Акустические изображения были получены путем перемещения акустической головки прецизионными шаговыми двигателями с шагом 30 мкм и скоростью перемещения до 50 мм/с. Акустический объектив с фокусным расстоянием 13,5 мм обеспечивал рабочий ход по глубине проникновения до 10 мм. В качестве иммерсионной жидкости между объективом и роговицей глаза использовались раствор Рингера (Рингер-СОЛЮфарм) или же стандартный гель для

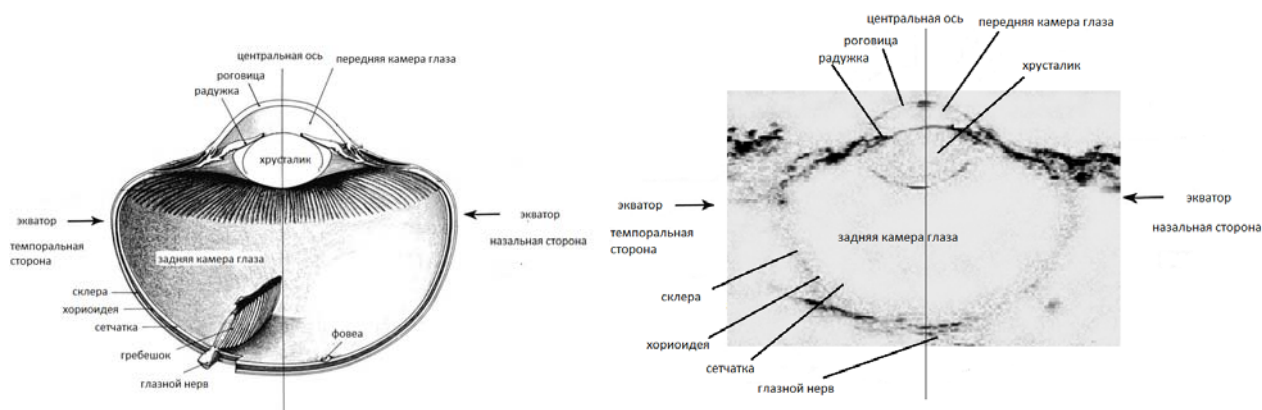


Рисунок 1. Акустическое изображение (BD-scan) глаза цыпленка *Coturnix japonica* на 30-е сутки развития, (правый рисунок), в сопоставлении с известной схемой глаза птиц отряда Galliformes (левый рисунок)

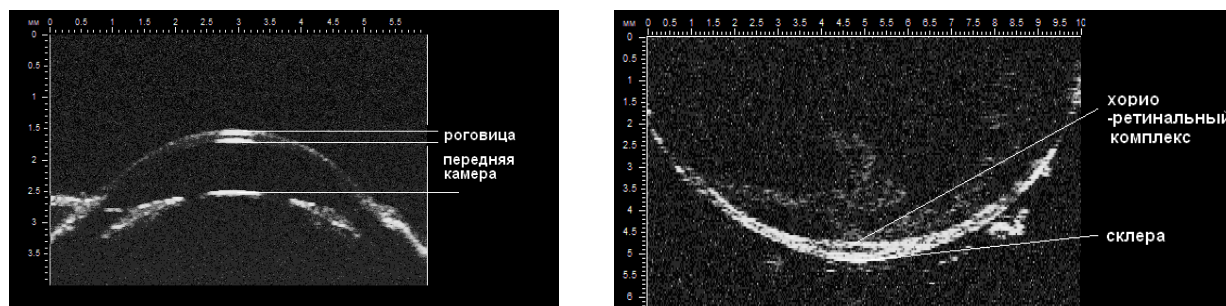


Рисунок 2. BD-scan роговицы (слева) и глазное дно на уровне склеры (справа) взрослого перепела. По осям приборной записи показаны размеры в мм

ультразвуковой медицинской диагностики. Частота акустического импульса 50 МГц позволила оценивать размеры глазных структур с погрешностью до 15 мкм.

Были исследованы глаза цыплят и взрослых птиц *Coturnix japonica*. Измерения проводились на декапитированных головах со стороны роговицы при их естественном положении в глазных орбитах. На рисунке 1 сопоставлены известный схематический рисунок глаза птиц семейства Galliformes и полученное нами акустическое изображение глаза *Coturnix japonica*. На этом эхолокационном изображении хорошо различима геометрия и размеры глаза в целом, а также основные значимые элементы оптики глаза: роговица, радужка, передняя камера глаза, хрусталик, задняя камера глаза, глазное дно. Хорошо визуализируются внешние оболочки глаза: роговица и склера (рис. 2). Измерение общего размера глаза вдоль его оптической оси выполнялось по положению крайнего эхоимпульса, соответствующего дну склеры. Амплитуда акустического эхосигнала давала представление об относительной плотности наблюдаемой структуры. При этом интенсивность акустического контраста на изображении определяется, в том числе, кривизной структурных элементов и наличием микронных и субмикронных неоднородностей в них, таких как уплотнения, отслоения, искривления, смещение относительно оптической оси.

Эхолокационные точечные сигналы, направленные перпендикулярно по центру роговицы позволили измерять размеры и положение основных рефракционных составляющих по аксиальной оси глаза (рис. 3).

Измерения были проведены для цыплят 3-х возрастов и взрослой птицы, для левого и правого глаза, на выборке из пары цыплят с одинаковым весом для каждого возраста. В каждой группе определялась величина среднеквадратичного отклонения, величина которой варьировалась внутри интервала погрешности ультразвукового измерения (± 15 мкм). Компьютерное изображение глаза, сформированное в результате эхолокационного поточечного сканирования, позволяло уверенно визуализировать форму и размеры глаза в целом, роговицы и склеры, хрусталика и стекловидного тела. В таблице 1 приведены размеры этих структур для цыплят 3-х возрастов и взрослой птицы *Coturnix japonica*.

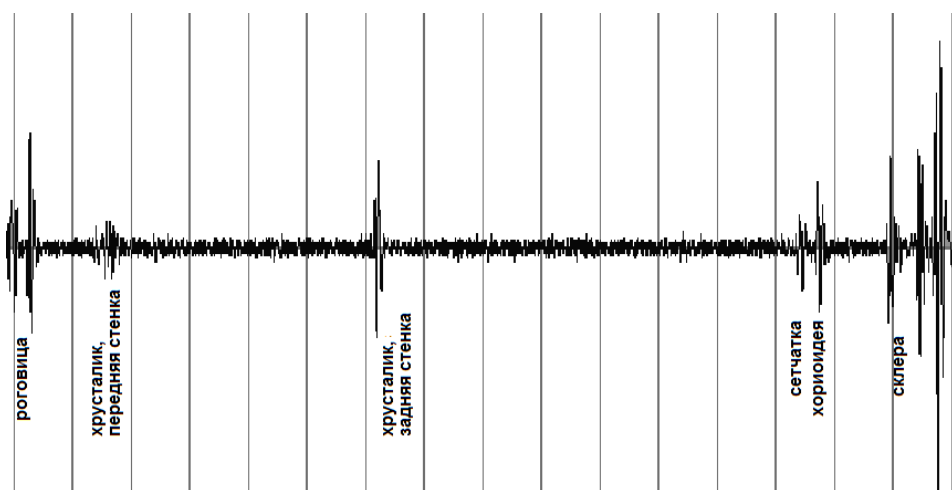


Рисунок 3. Эхограмма глаза перепела при однотоочном А-сканировании. По горизонтальной развертке размеры, вычисляемые по времени возвращения эхолокационного ответа. Амплитуда ответов соответствует относительной механической плотности данной структуры

Таблица 1. Результаты морфометрических измерений глаз *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Приведено среднее значение в миллиметрах для выборки по 2-м птицам (4 глаза) каждого возраста. Величина квадратичного отклонения варьируется внутри погрешность измерения (± 15 мкм)

Возраст, сутки	Размер глаза по аксиальной оси	Диаметр глаза по экватору	Толщина роговицы	*Передняя камера, граничные значения.	Хрусталик по аксиальной оси	Задняя камера по аксиальной оси	Склера
10	5.8	8,3	0,13	0,55-0,83	1,7	3,25	0,125
20	6.6	8,7	0,135	0,56-0,88	1,85	3,95	0,125
30	7.1	10,1	0,17	0,23-0,69	1,9	4,4	0,145
>100	8.5	10,8	0,23	0,95	2,5	4,7	0,150

*Разбросы по измерениям размеров передней камеры, вероятно, связаны с падением внутриглазного давления в условиях *in situ*. Наиболее близкими к реальным размерам являются максимальные значения измерений.

Были также выполнены успешные предварительные измерения *in vivo* при фиксированном положении головы интактных животных. В целом, проведенная работа показала эффективность ультразвуковой акустической микроскопии для определения рефракционных составляющих оптики глаза мелких лабораторных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-00708.

Список литературы / References:

1. Патент РФ № 2112969 Малогабаритный акустический микроскоп. Дата публикации 1998.06.10. [Patent RF № 2112969 Compact Acoustic Microscope 1998.06.10. (In Russ.)]
2. Субочев П.В., Орлова А.Г., Турчин И.В., Петронюк Ю.С., Храмова Е.А., Левин В.М. Ультразвуковые технологии высокого разрешения для исследования биологических объектов. *Известия РАН Серия Физическая*, 2018, т. 82, № 5, с. 572-577. [Subochev P.V., Orlova A.G., Turchin I.V., Petronyuk Yu.S., Khramtsova E.A., Levin V.M. High-resolution ultrasound technology for the study of biological objects. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2018, vol. 82, no. 5, pp. 572-577. (In Russ.)]
3. Сигаева А.О., Сerezникова Н.Б., Погодина Л.С., Трофимова Н.Н., Дадашева О.А., Гурьева Т.С., Зак П.П. Изменения сосудистой оболочки глаза разновозрастных групп японского перепела *Coturnix japonica* в зависимости от спектрального состава освещения. *Сен. сис.*, 2015, т. 29, № 4, с. 354-361. [Sigaeva A.O., Serezhnikova N.B., Pogodina L.S., Trofimova N.N., Dadasheva O.A., Gurieva T.C., Zak P.P. Changes in the choroid of different age groups of the Japanese quail *Coturnix japonica* depending on the spectral composition of illumination. *Sensory Systems*, 2015, vol. 29, no. 4, pp. 354-361. (In Russ.)]
4. Сerezникова Н.Б., Погодина Л.С., Липина Т.В., Трофимова Н.Н., Гурьева Т.С., Дадашева О.А., Зак П.П. Возрастные изменения пигментного эпителия сетчатки японского перепела *Coturnix japonica* при повседневном освещении синим светом. *Клиническая и экспериментальная морфология*, 2017, т. 21, № 1, с. 48-53. [Serezhnikova N.B., Pogodina L.S., Lipina T.V., Trofimova N.N., Gurieva T.C., Dadasheva O.A., Zak P.P. Age-related changes in retinal pigment epithelium of Japanese quail *Coturnix japonica* by everyday blue light. *Clinical and experimental morphology*, 2017, vol. 21, no. 1, pp. 48-53. (In Russ.)]

ACOUSTIC-MICROSCOPIC STUDY OF AGE-RELATED CHANGES IN EYE STRUCTURES OF JAPANESE QUAIL *COTURNIX JAPONICA***Zak P.P.¹, Petronuk Yu.S.¹, Khramtsova E.A.¹, Trofimova N.N.¹, Misiakov A.N.¹, Gurieva T.S.², Dadasheva O.A.², Levin V.M.¹**¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics (IBCP), RAS
*Kosygina str., 4, Moscow, 119994, Russia; e-mail: pavelzak@mail.*² Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences
Khoroshevskoye av., 76A, Moscow, 123007, Russia

Abstract. The studies was evaluated the capabilities of scanning ultrasonic microscopes invented in Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS for studies of the structures of the eye small laboratory animals. The object of the study were chicks of Japanese quail *Coturnix japonica*. The range of eye size was determined by the age of birds from 10 to 30 days of age. Characteristics of ultrasonic microscopes were adequate to the sizes of the measured eyes 5-10 mm in diameter with measurement error up to 15 microns. Point-by-point scanning of the eye for plane and depth in terms of in situ provided the computer-generated 3-dimensional visualization of the general geometry of eyes, and the basic structures of the eye optics. The size and shape of the eyeball, anterior and posterior chamber of the eye, lens, corneal thickness, sclera and chorio-retinal complex were measured. These data offer the prospect of in vivo non-invasive measurements in modeling of experimental child myopia on chicks of Japanese quail.

Key words: *eye, ultrasonic microscopy, age, Japanese quail Coturnix japonica.*

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСОВ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР С БЕЛКАМИ КРОВИ

Гармаза Ю.М., Зубрицкая Г.П., Слобожанина Е.И.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru

Поступила в редакцию: 19.07.2019

Аннотация. Анализ параметров флуоресценции тиофлавина Т, который является специфичным для обнаружения амилоидных фибрилл, и параметров собственной флуоресценции белков крови позволил установить, что образование комплекса “амилоидные структуры – белки плазмы крови” зависит от температуры инкубации, так как связи между белками и их лигандами ослабевают при повышенных температурах. Продемонстрировано, что изменение pH среды инкубации, как в кислую, так и в щелочную области также сказывается на образовании комплексов сывoroточного альбумина с амилоидными структурами, по-видимому, в результате изменения связывающей способности альбуминов при их окислении. Выявлено, что эссенциальные (Zn, Cu) микроэлементы, взаимодействуя с комплексом “амилоидные структуры – белки плазмы крови”, приводят к модификации параметров собственной и зондовой флуоресценции, что подтверждает предположение о существовании металл-связывающих сайтов в амилоидных фибриллах для ионов металлов.

Ключевые слова: амилоидные структуры, белки крови, спектральные характеристики, физико-химические факторы.

ВВЕДЕНИЕ

Важным звеном в возникновении многих нейродегенеративных заболеваний является нарушение фолдинга белков с последующим образованием амилоидных структур. При амилоидозах, когда процесс упаковки белка происходит с ошибками, агрегаты определенных размеров откладываются внутри или вне клетки как нерастворимые депозиты. Накопление амилоидных фибрилл разрушает структуру и функционирование органов и тканей, приводя к заболеванию и иногда – к летальному исходу. При изучении механизмов развития болезни Альцгеймера в ткани мозга было обнаружено присутствие амилоидных фибрилл, которые окружены мертвыми или умирающими нейронами [1]. Амилоидные отложения найдены не только при болезни Альцгеймера и Паркинсона, но и при диабете второго типа, наследственной амилоидной полинейропатии, системном амилоидозе и др. [2-4]. К сожалению, процессы, лежащие в основе аномальной агрегации белка и ее патологического проявления, изучены еще недостаточно. Выяснение молекулярных механизмов амилоидозов, установление природы амилоидных белковых структур и их свойств, развитие терапевтических методов лечения и предупреждения этих заболеваний, а также разработка их прижизненной диагностики являются актуальными задачами.

Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют, что в настоящее время не существует эффективных методов диагностики амилоидозов [5]. В последние годы складывается убеждение, что первопричиной амилоидоза нейронов и их гибели при болезни Альцгеймера является накопление постсинаптических фрагментов A β , содержащих 40 или 42 аминокислотных остатков. Часть фрагментов приобретает структуру нормально функционирующих A β , другая часть конформационно модифицируется в структуру патогенных A β . На сегодняшний день известно более 20 белков, образующих амилоидные фибриллы *in vivo* и участвующих в патогенезе амилоидозов – тау-белок, хантингтин, амилин, A β -пептиды, α -синуклеин, инсулин, лизоцим, миоглобин, транстиретин и др., а также белки, амилоиды которых изучены только *in vitro* [2]. Все эти белки различаются между собой по аминокислотным последовательностям, вторичным и третичным структурам. Однако, несмотря на это, образованные ими амилоидные фибриллы имеют β -складчатую структуру [6].

Исследование фибрилл, полученных *ex vivo* и *in vitro*, показало, что амилоидные структуры обладают схожими морфологическими характеристиками. Все фибриллы вне зависимости от их происхождения стабилизируются сетью внешних и внутримолекулярных водородных связей между основными амидными группами цепи и карбонильными группами, которые идентичны для всех пептидов и белков. Предположено, что способность формировать амилоидные фибриллы – это неотъемлемая характеристика полипептидной цепи и большинство, если не все полипептиды, способны образовывать амилоиды, при этом их способность к самоорганизации в амилоиды может быть различной [7]. Физико-химические методы исследования амилоидов включают микроскопические, оптические и флуоресцентные методы, методы электронного парамагнитного резонанса, электрохимический и электрофоретический методы, гель-фильтрации и масс-спектрометрические методы, а также люминесцентные методы анализа, которые наиболее отражают характеристики комплексов амилоидных структур с белками крови [8].

Целью работы явилось изучение влияния физико-химических факторов (температура, pH среды, ионный состав) на образование комплексов “амилоидные структуры–белки плазмы крови” методами люминесценции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы коммерческие сывороточный альбумин быка (САБ) и сывороточный альбумин человека (САЧ), растворенные в 10 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 0,155 М NaCl (забуференный NaCl), pH 7,4, до конечных концентраций от 0,2 мг/мл до 1,5 мг/мл.

Амилоидные структуры получали из лизоцима куриного яйца, растворенного в 10 мМ HCl pH 2,0 при инкубации 55°C в течение 6 суток при постоянном перемешивании [9, 10]. Ранее нами показано, что выдерживание раствора лизоцима в указанных выше условиях в течение 5-7 суток приводит к образованию амилоидных структур [11, 12]. Использованная концентрация лизоцима – 1,34 мМ. В инкубационную среду добавляли 0,02% азида натрия для устранения бактериального загрязнения. Контроль за процессом образования амилоидов из лизоцима осуществлялся ежедневно посредством измерения интенсивности флуоресценции тиюфлавина Т ($\lambda_{\text{возб/рег}} = 440/485$ нм). Концентрацию полученных амилоидных фибрилл оценивали по модифицированному методу Лоури. Полученные амилоидные фибриллы ресуспензировали в 10 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,155 М NaCl.

Для создания модельной системы “амилоидные структуры–белки плазмы крови” к буферным растворам САБ и САЧ в различных концентрациях добавляли 50 мкл полученных из лизоцима куриного яйца амилоидных фибрилл (конечная концентрация белка 0,01 мг/мл) и смесь инкубировали 3 ч, 37°C при постоянном перемешивании.

Для оценки параметров люминесценции тиюфлавина Т буферные растворы САЧ и САБ до и после их инкубации с амилоидными структурами, инкубировали с водным раствором тиюфлавина Т (конечная концентрация составляла 10 мкМ) в течение 10 мин при $t=20\pm 2^\circ\text{C}$. Люминесцентные измерения проводили при $\lambda_{\text{возб/рег}} = 440/485$ нм.

Спектры собственной флуоресценции буферных растворов САЧ и САБ до и после инкубации с амилоидными структурами регистрировали в ультрафиолетовой области спектра 320-380 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм) и видимой области спектра 400-500 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм).

Все люминесцентные измерения выполнены на спектрофлуориметре CM2203 (“СОЛАР”, Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре «Спекорд М40» (Германия).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Уилкоксона в программе STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью создания модельной тест-системы “амилоидные структуры–белки крови” были изучены параметры собственной флуоресценции белков плазмы крови (САЧ и САБ) и зондовой флуоресценции в нативном состоянии и при взаимодействии их с амилоидными структурами. Как видно из рисунка 1, в зависимости от концентрации САЧ и САБ в забуференном растворе NaCl pH 7,4 (от 0,2 мг/мл до 1,5 мг/мл) наблюдается рост интенсивности триптофановой флуоресценции. Однако, если интенсивность собственной флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 296$ нм) САБ увеличивается в 4-5 раз при повышении его концентрации в растворе, то рост данного параметра флуоресценции для САЧ составляет порядка 100-200%, что объясняется отличием количества триптофанилов в белковых глобулах САЧ и САБ (рис. 1 а, б). При проведении сравнительного анализа между интенсивностью собственной флуоресценции САЧ и САБ и их концентрацией в растворе установлено, что использование САЧ и САБ в концентрации 1 мг/мл является наиболее подходящим для изучения взаимодействия альбуминов с амилоидными структурами.

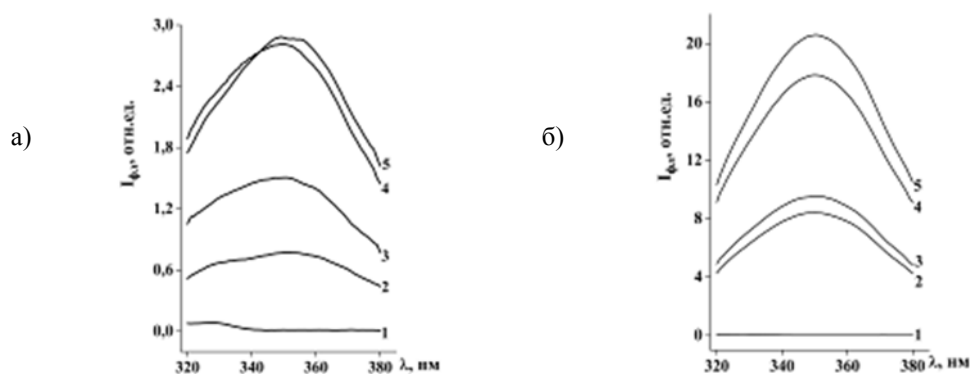


Рисунок 1. Зависимость спектров собственной флуоресценции раствора САЧ (а)/САБ (б) от концентраций белка (1 – 0 мг/мл; 2 – 0,2 мг/мл; 3 – 0,5 мг/мл; 4 – 1,0 мг/мл; 5 – 1,5 мг/мл)

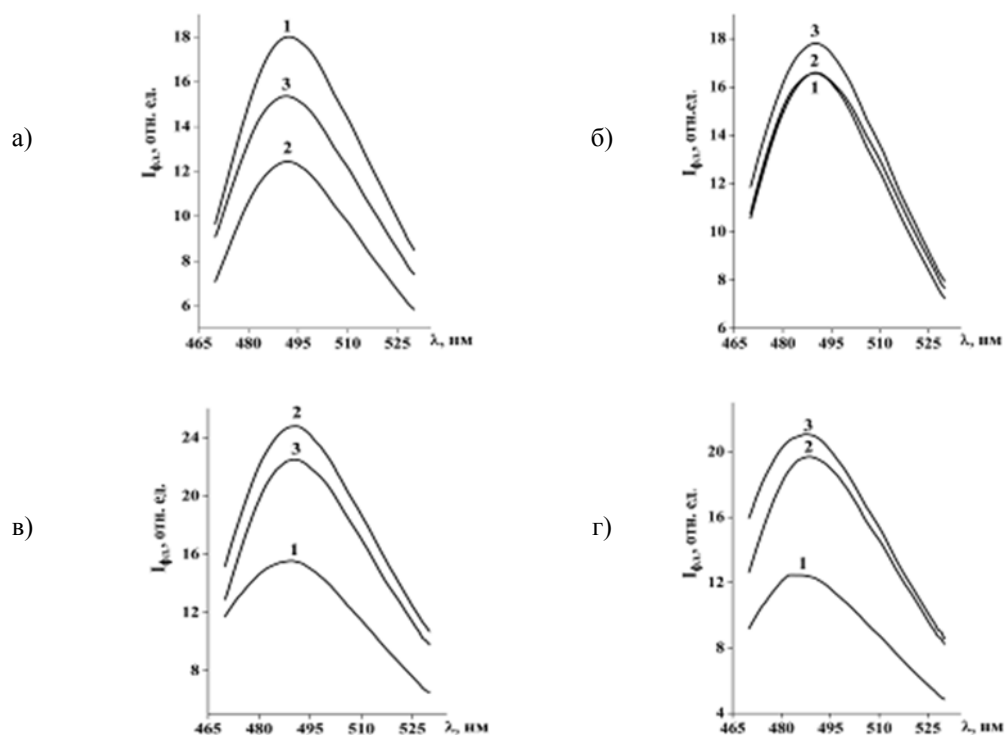


Рисунок 2. Спектры флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в модельную систему “белковая глобула САЧ (а, в) / САБ (б, г) + амилоидные структуры” в зависимости от температуры (а, б) (1 – 20°C; 2 – 37°C; 3 – 65°C) и pH среды инкубации (в, г) (1 – 5,4; 2 – 7,0; 3 – 8,0)

Как известно, процессы формирования комплексов амилоидных фибрилл с различными белками *in vitro* характеризуются разной скоростью. Она зависит от состава раствора, температуры, pH среды и др. Поэтому была проведена оценка собственной флуоресценции белков ($\lambda_{\text{возб/рег}} = 296/350$ nm) и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т ($\lambda_{\text{возб/рег}} = 440/495$ nm) в комплексах “САЧ/САБ–амилоидные фибриллы” при различных условиях их инкубации: температура: $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 37°C , 65°C и буферные системы с pH 5,4; 7,0 и 8,0. Тиофлавин Т является подходящим зондом для обнаружения амилоидных структур как *in vivo*, так и *in vitro*. Это обусловлено тем, что свободный краситель в водном растворе имеет низкий квантовый выход, а при взаимодействии с белками в состоянии амилоидных фибрилл его квантовый выход возрастает на несколько порядков [13, 14]. Как видно из рисунков 2а и 2б, инкубация САЧ с амилоидными фибриллами при 37°C сопровождается снижением интенсивности флуоресценции ThT в среднем на 30–35 % по сравнению с выдерживанием при $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Повышение температуры инкубации комплекса “САЧ–амилоидные фибриллы” до 65°C сопровождается также снижением интенсивности флуоресценции тиофлавина Т по сравнению с инкубацией при $20 \pm 2^\circ\text{C}$, но в меньшей степени (в среднем на 15–20%) (рис. 2а). Однако увеличение температуры инкубации другого комплекса “САБ–амилоидные фибриллы” до 65°C сопровождается ростом интенсивности флуоресценции тиофлавина Т по сравнению с инкубацией при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в среднем на 10%, на фоне отсутствия видимых различий в интенсивностях флуоресценции красителя при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и 37°C (рисунок 2б).

Параллельно с оценкой интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в комплексах “САЧ/САБ–амилоидные фибриллы” были изучены параметры собственной флуоресценции белков плазмы крови. Как видно из рисунков 3а и 3б, 3-часовая инкубация САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима при 37°C приводит к двукратному увеличению интенсивности триптофановой флуоресценции исследуемого комплекса в случае использования САЧ, но к снижению изучаемого параметра в случае САБ примерно в 1,5 раза по сравнению со значениями интенсивности флуоресценции нативных растворов САЧ и САБ. В то же время установлено, что повышение температуры инкубации альбуминов с амилоидными фибриллами до 65°C сопровождалось разнонаправленными изменениями параметров собственной флуоресценции белков. Так, в случае комплекса “САЧ–амилоидные структуры” нами зарегистрировано повышение значения исследуемого параметра в среднем на 5–10 %, а в случае САБ – снижение на 20%.

При изучении влияния pH среды инкубации на образование комплексов амилоидов с белками крови обнаружено, что 3-часовая инкубация (37°C) САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима в условиях щелочной среды (pH 8,0) приводит к увеличению интенсивности триптофановой люминесценции комплекса “амилоидные структуры–белки плазмы крови” в среднем на 30% для САБ и на 15% для САЧ по сравнению с инкубацией в кислой (pH 5,4) и нейтральной (pH 7,0) средах (рис. 4в и 4г). Стоит отметить, что изменение концентрации ионов водорода в буферном растворе (10 mM натрий фосфатный буфер), используемом для разведения САБ и САЧ, а также амилоидных фибрилл, существенно не влияет на интенсивность триптофановой

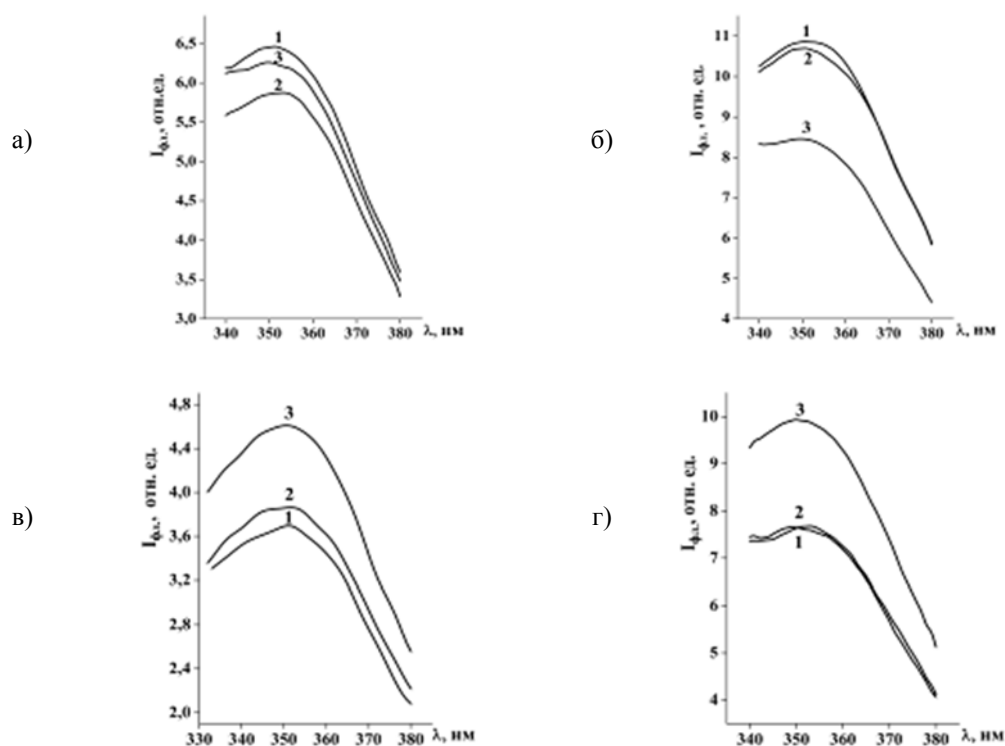


Рисунок 3. Спектры триптофановой флуоресценции буферных растворов САЧ (а, в) / САБ (б, г) в комплексе с амилоидными структурами в зависимости от температуры инкубации (а, б) (1 – 20°C; 2 – 37°C; 3 – 65°C) и pH среды инкубации (в, г) (1 – 5,4; 2 – 7,0; 3 – 8,0)

флуоресценции белков. Установлено, что при инкубации белков плазмы крови с амилоидными фибриллами в условиях кислого значения pH интенсивность флуоресценции тиреофлавина Т находилась на низком уровне, то в условиях нейтральной и щелочной pH – возрастала примерно в 1,5 раза для САБ и в 2 раза для САЧ (рис. 2в и 2г).

Полученные результаты позволяют заключить, что образование комплексов “амилоидные структуры–белки плазмы крови” зависит от температуры инкубации, так как связь между белками и их лигандами обычно ослабевает при высоких температурах. С другой стороны, установлено, что значение pH среды инкубации также влияет на образование комплексов амилоидов с САЧ и САБ (снижается в области pH 5,4), что может явиться результатом изменения связывающей способности альбуминов при их окислении.

В связи с широким распространением заболеваний, связанных с отложением амилоидных фибрилл, большой интерес представляют соединения, способные подавлять агрегацию амилоидных белков, тем самым, защищая клетки от их токсического действия. Одними из таких перспективных соединений являются металлы.

Существуют данные, свидетельствующие о том, что ионный состав среды оказывает влияние на образование и токсичность амилоидных структур. Например, было показано, что цинк и медь снижают способность β -амилоидного белка образовывать β -агрегаты, что усиливает защитные свойства клеток от токсичности, вызванной амилоидными структурами [15]. При этом цинк сильнее подавляет агрегацию β -амилоидного белка и способен защитить клетки от вызванного амилоидными структурами окислительного стресса [16]. Другие исследования показали, что добавление катионов металлов, таких как Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Ni^{2+} способствует образованию вторичной структуры α -синуклеина и значительно ускоряет образование фибрилл [17]. Также в некоторых исследованиях установлена связь дисбаланса содержания ионов меди и цинка в клетках мозга с развитием болезни Альцгеймера [18]. В экспериментах, выполненных на культурах клеток, было показано, что медь может ускорять гибель клеток при сочетанном действии с амилоидными белками, вызывая окислительный стресс и усиливая токсичность амилоидных структур.

Исходя из вышеизложенного, на следующем этапе исследования было изучено влияние эссенциальных микроэлементов Cu^{2+} и Zn^{2+} на образование комплекса амилоидных структур с белками плазмы крови. В качестве источников ионов меди (II) и цинка (II) были использованы соли соответствующих элементов: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и ZnCl_2 .

Как видно из рисунка 4, 3-часовая инкубация (37°C) растворов САБ и САЧ с амилоидными фибриллами из лизоцима в присутствии Zn^{2+} и Cu^{2+} в конечной концентрации в инкубационной среде 100 мкМ и 20 мкМ, соответственно, приводит к увеличению интенсивности триптофановой флуоресценции комплекса “амилоидные структуры–альбумины” в среднем на 10–20 % в случае САБ и снижению на 15–25% в случае САЧ, по сравнению с комплексом “амилоидные фибриллы–САБ / САЧ”. Более того, стоит отметить, что добавление Cu^{2+} в инкубационную среду САЧ (рис. 4б), приводит к сдвигу максимума флуоресценции в длинноволновую

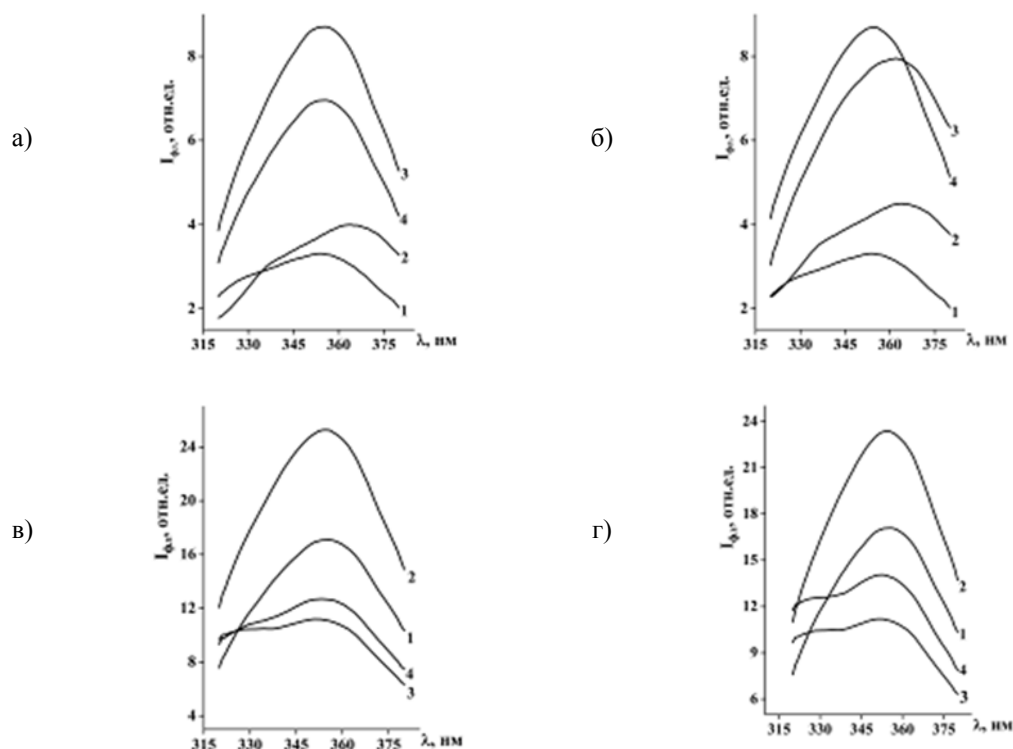


Рисунок 4. Спектры триптофановой флуоресценции буферных растворов САЧ (а, в) / САБ (б, г) в комплексе с амилоидными структурами (Ам) и ионами цинка (а, в) и меди (б, г) (1 – САЧ /САБ; 2 – САЧ/САБ+ Zn^{2+} (Cu^{2+}); 3 – САЧ/САБ+Ам; 4 – САЧ/САБ+Ам+ Zn^{2+} (Cu^{2+}))

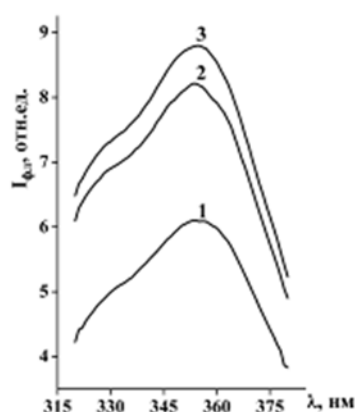


Рисунок 5. Спектры собственной флуоресценции комплексов “амилоидные структуры – Me^{n+} ” (1 – Ам; 2 – Ам+ Zn^{2+} ; 3 – Ам+ Cu^{2+})

область в среднем на 15-20 нм, а при образовании комплексов “амилоидные структуры-САБ/САЧ” и “амилоидные структуры-САБ/САЧ- Me^{n+} ” наблюдается появления второго пика в спектре люминесценции при $\lambda = 320$ нм, который нетипичен для нативного раствора САБ/САЧ или САБ/САЧ+ Me^{n+} (рис. 4). Данный факт может служить флуоресцентным критерием обнаружения амилоидных фибрилл в плазме крови человека. При проведении сравнительного анализа интенсивности собственной флуоресценции растворов амилоидных фибрилл и амилоидных фибрилл проинкубированных с ионами исследуемых металлов мы наблюдаем четкую тенденцию к ее росту в 1,25-2 раза при взаимодействии с Zn^{2+} и Cu^{2+} (рис. 5).

Нами была проведена оценка интенсивности флуоресценции тιοфлавина Т, встроенного в комплексы “амилоидные структуры-белки плазмы крови” до и после воздействия на них ионов исследуемых металлов. Как видно из рисунка 6, инкубация САБ и САЧ с амилоидными фибриллами в присутствии Zn^{2+} и Cu^{2+} приводит к 2-кратному снижению интенсивности флуоресценции ТнТ в случае САБ и к противоположному эффекту (увеличению исследуемого параметра) в случае САЧ. При этом тιοфлавин Т, встроенный в водные растворы САБ/САЧ или в комплексы САБ/САЧ с Zn^{2+} и Cu^{2+} , не флуоресцирует (рис. 6а и 6б).

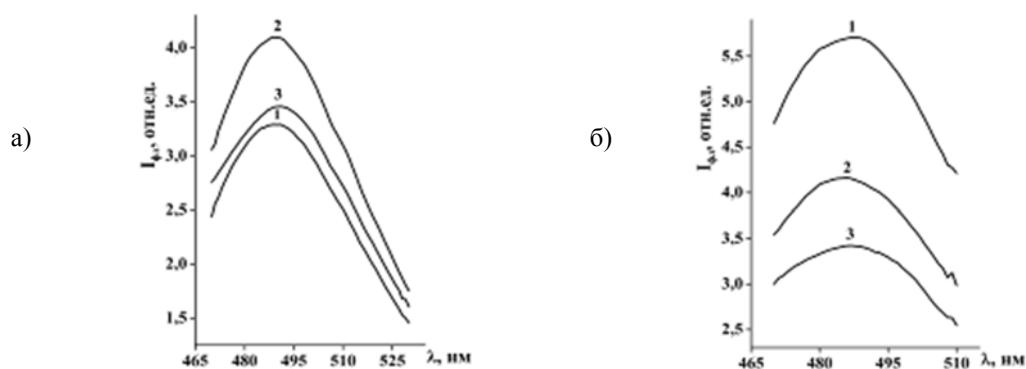


Рисунок 6. Спектры флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в комплексы “САЧ – амилоидные структуры – Me^{n+} ” (а) и “САБ – амилоидные структуры – Me^{n+} ” (б) (1 – САЧ/САБ+ThT; 2 – САЧ/САБ+ Cu^{2+} +ThT; 3 – САЧ/САБ+ Zn^{2+} +ThT)

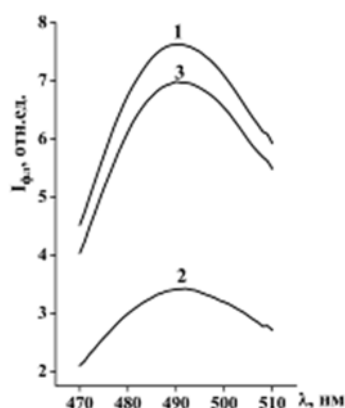


Рисунок 7. Спектры флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в комплекс “амилоидные структуры– Me^{n+} ” (1 – Ам; 2 – Ам+ Zn^{2+} ; 3 – Ам+ Cu^{2+})

При проведении сравнительного анализа интенсивности флуоресценции ThT, встроенного в амилоидные фибриллы из лизоцима и в комплексы “амилоидные фибриллы – Me^{n+} ”, мы наблюдали четкую тенденцию к ее снижению в среднем в 3 раза при комплексообразовании с Zn^{2+} , в то время как комплексообразование с Cu^{2+} приводило к 20% ингибированию интенсивности флуоресценции ThT (рис. 7).

Таким образом, полученные результаты подтверждает литературные данные о существовании металл-связывающих сайтов в амилоидных фибриллах именно для Zn^{2+} и Cu^{2+} . Более того, продемонстрировано, что ионы исследуемых эссенциальных микроэлементов, связываясь с β -амилоидами могут модулировать процессы их агрегации и, соответственно, клеточную токсичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены параметры флуоресценции специфического зонда на амилоидные структуры тиофлавина Т и собственной флуоресценции белков плазмы крови (сывороточного альбумина человека (САЧ) и сывороточного альбумина быка (САБ)) в буферной системе до и после их взаимодействия с амилоидными структурами. Подобраны экспериментальные условия (соотношение концентраций белков плазмы крови и амилоидных фибрилл, температура, время взаимодействия белков с амилоидными структурами) для создания модельной тест-системы “амилоидные структуры-белки крови”.

2. Изучено влияние температуры и pH среды инкубации на образование комплексов амилоидов с белками крови. Для этого была оценена интенсивность флуоресценции зонда тиофлавина Т в комплексах САЧ / САБ с амилоидными фибриллами из лизоцима при различных температурных условиях их инкубации (20°C, 37°C, 65°C) и различных значениях pH среды (5,4; 7,0; 8,0). Установлено, что образование комплекса “амилоидные структуры-белки крови” зависит от температуры инкубации, так как связи между белками и их лигандами обычно ослабевают при повышенных температурах. С другой стороны, установлено, что изменение pH среды инкубации в кислую область также сказывается на образовании комплексов САБ / САЧ с амилоидами, что может явиться результатом изменения связывающей способности альбуминов при их окислении. Показано, что изменение pH среды инкубации в щелочную область также сказывается на образовании комплексов САБ / САЧ с амилоидными структурами.

3. Проведена оценка параметров собственной флуоресценции белков в комплексах САЧ / САБ с амилоидными фибриллами из лизоцима при различных температурных условиях их инкубации (20°C, 37°C, 65°C) и при различных pH буферных систем (5,4; 7,0 и 8,0). Показано, что параметры собственной флуоресценции белков в системах “амилоидные структуры–белки плазмы крови” зависят от типа белков, входящих в систему, а также от температуры и pH среды инкубации.

4. Изучено влияние эссенциальных (Zn^{2+} , Cu^{2+}) микроэлементов на образование комплексов амилоидных структур с белками плазмы крови. Для этого были оценены параметры собственной флуоресценции белков в комплексах САЧ и САБ с амилоидными фибриллами из лизоцима, а также интенсивность флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в данную систему и установлено, что исследуемые микроэлементы, внесенные в инкубационную среду, существенно изменяют параметры флуоресценции исследуемых образцов. Полученные результаты подтверждает предположение о существовании металл-связывающих сайтов в амилоидных фибриллах для эссенциальных микроэлементов, которые, связываясь с β -амилоидами, вероятно, модулируют процессы их агрегации.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант № M15-112.

Список литературы / References:

1. Lansbury P.T. Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, vol. 96, no. 7, DOI: 10.1073/pnas.96.7.3342.
2. Uversky V.N., Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, vol. 169, no. 2, DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.12.008.
3. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, vol. 2, DOI: 10.1038/35081564.
4. Batarseh Y.S., Duong Q.-V., Mousa Y.M., Al Rihani S.B., Elfakhri K., Kaddoumi A. Amyloid- β and astrocytes interplay in amyloid- β related disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 3, DOI: 10.3390/ijms17030338.
5. Louw C., Gordon A., Johnston N., Mollatt C., Bradley G., Whiteley C.G. Arginine deiminases: therapeutic tools in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2007, vol. 22, no. 1, DOI: 10.1080/14756360600990829.
6. Довидченко Н.В., Леонова Е.И., Галзичка О.В. Механизмы образования амилоидных фибрилл. *Успехи биологической химии*, 2014, т. 54, с. 203-230. [Dovidchenko N.V., Leonova E.I., Galzickaya O.V. Mechanisms of amyloid fibrils formation. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, 2014, vol. 54, pp. 203-230. (In Russ)]
7. Dobson C.M. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2001, vol. 356, DOI: 10.1098/rstb.2000.0758.
8. Радько С.П., Хмелева С.А., Супрун Е.В., Козин С.А., Бодоев Н.В., Макаров А.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. Физико-химические методы исследования агрегации β -амилоида. *Биомедицинская химия*, 2015, т. 61, вып. 2, с. 258-274. [Radko S.P., Khmeleva S.A., Suprun E.V., Kozin S.A., Bodoev N.V., Makarov A.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. Physico-chemical methods for studying amyloid- β aggregation. *Biochemistry, Supplemental Series B*, 2015, vol. 9, no. 3, pp. 258-274. (In Russ)]
9. Huang B., He J., Ren J., Yan X.Y., Zeng C.M. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross – linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 25, DOI: 10.1021/bi900219c.
10. Malisauskas M., Ostman J., Darinskas A., Zamotin V., Liutkevicius E., Lundgren E., Morozova-Roche L.A. Does the cytotoxic effect of transient amyloid oligomers from common equine lysozyme in vitro imply innate amyloid toxicity? *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 8, DOI: 10.1074/jbc.M407273200.
11. Лукьяненко Л.М., Зубрицкая Г.П., Венская Е.И., Скоробогатова А.С., Кутько А.Г., Слобожанина Е.И. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов. *Новости медико-биологических наук*, 2013, т. 7, № 1, с. 9-13. [Lukyanenko L.M., Zubritskaja G.P., Venskaya E.I., Skarabahatava A.S., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. Effect of amyloids on the physico-chemical state of the lipid bilayer of human erythrocytes. *News of biomedical sciences*, 2013, vol. 7, no. 1, p. 9-12. (In Russ)]
12. Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Венская Е.И., Слобожанина Е.И. Индуцированная амилоидами модификация мембран эритроцитов человека. Влияние антиоксидантов. *Доклады НАН Беларуси*, 2014, № 4, с. 78-81. [Zubritskaja G.P., Lukyanenko L.M., Venskaya E.I., Slobozhanina E.I. Modification of human erythrocyte membranes induced by amyloids. *Doklady Natsional'noi Akademii nauk Belarusi*, 2014, no. 4, pp. 78-81. (In Russ.)]
13. Krebs M.R., Bromley E.N., Donald A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. *Structural Biology*, 2005, vol. 149, no. 1, DOI: 10.1016/j.jsb.2004.08.002.
14. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Accounts of Chemical Research*, 2012, vol. 45, DOI: 10.1021/ar300053p.
15. Duce J., Bush A. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, 2010, vol. 92, no. 1, DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.04.003.
16. Tõugu V., Tiiman A., Palumaa P. Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. *Metallomics*, 2011, vol. 3, no. 3, DOI: 10.1039/c0mt00073f.

17. Greenwald J., Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure*, 2010, vol. 18, no. 10. DOI: 10.1016/j.str.2010.08.009.
18. Lau T.L., Ambroggio E.E., Tew D.J., Cappai R., Masters C.L., Fidelio G.D., Barnham K.J., Separovic F. Amyloid- β peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 356, no. 3. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.11.091.

SPECTRAL AND LUMINESCENCE CHARACTERISTICS OF THE AMYLOID STRUCTURES COMPLEXES WITH BLOOD PROTEINS

Harmaza Y.M., Zubritskaya H.P., Slobozhanina E.I.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus
Akademicheskaya st., 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru

Abstract. Analysis of the fluorescence parameters of thioflavin T, which is specific for the amyloid fibrils detection, and the parameters of the intrinsic fluorescence of blood proteins allowed to establish that the formation of the complex "amyloid structures – serum proteins" depends on the incubation temperature because of the bonds between proteins and their ligands become weaker under elevated temperatures. It was demonstrated that alteration of the incubation medium pH, both to the acidic and alkaline region, also affects on the formation of the complexes of serum albumin with amyloid structures, apparently as a result of the albumins binding ability changing during their oxidation. It was found that essential (Zn, Cu) trace elements interacting with the complex "amyloid structures – serum proteins" lead to modification of parameters as an intrinsic fluorescence as a fluorescent probe, that confirms the assumption about existence of the metal-binding sites in amyloid fibrils for metal ions.

Key words: amyloid structures, blood proteins, spectral characteristics, physical and chemical factors.

МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАННЫЕ ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЕЙСТВИЯ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

Алексеева О.М.¹, Кременцова А.В.¹, Кривандин А.В.¹, Шаталова О.В.¹,
Голощапов А.Н.¹, Ким Ю.А.²

¹ ФБГУН Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля,
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: olgavek@yandex.ru

² Институт биофизики клетки РАН, ФБГУН «ФИЦ «Пушкинский
научный центр биологических исследований РАН»
г. Пушкино, РФ

Поступила в редакцию: 21.07.2019

Аннотация. Для оценки воздействия биологически активных веществ (БАВ) использовали последовательный ряд экспериментальных объектов: модельные – мультиламеллярные фосфолипидные липосомы (ФМЛ), сформированные из синтетического индивидуального фосфолипида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), и из смеси природных фосфолипидов яичного лецитина; органеллы – фрагментированный саркоплазматический ретикулум (ФСР) и тени эритроцитов (плазматическая мембрана с цитоскелетом); клетки – эритроциты и клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). В качестве БАВ применяли экзогенные вещества: мелафен, кофеин и его аналоги и антагонисты, фенозан и его производные, и эндогенные вещества – свободные жирные кислоты (СЖК), сывороточный альбумин, АТФ и соли магния и кальция. Регистрацию ответов экспериментальных объектов при воздействии БАВ проводили методами ДСК, малоуглового рентгеновского светорассеяния (МУРР), первичного светорассеяния под прямым углом в видимой области, методами потенциометрии. Определили методом ДСК концентрационные границы применения феноксана (10^{-5} М) и ИХФАНов (10^{-6} М) без деструкции микродоменной организации бислоев ФМЛ, сформированных из ДМФХ. Мелафен в широком диапазоне концентраций не нарушает структуру таких ФМЛ, но вызывает изменения термодинамических параметров плавления. ИХФАН-10 и феноксан изменяют параметры термоиндуцированной денатурации белковых микродоменов теней эритроцитов, мелафен не влияет. Методом МУРР показали отсутствие влияния мелафена в широком диапазоне концентраций на толщины бислоев и порядок упаковки в ФМЛ из природных фосфолипидов. Методом потенциометрии определили концентрационно-зависимое воздействие Mg^{2+} на активность Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} -канала в зависимости от присутствия СЖК в мембранах ФСР. СЖК и Mg^{2+} усиливают эффект активатора Ca^{2+} -канала – кофеина. Экстракция СЖК из ФСР сывороточным альбумином снижает эффект кофеина. Методом первичного светорассеяния показали угнетение мелафеном и феноксаном пуриновой Ca^{2+} -сигнализации в клетках АКЭ. Сделан вывод о возможности использования примененных методов и объектов для тестирования веществ с целью выявления биологической активности.

Ключевые слова: фосфолипиды; мультиламеллярные липосомы; биологически активные вещества; тени эритроцитов; эритроциты; ДСК; малоугловое дифракционное рассеяние.

Список сокращений: биологически активные вещества – БАВ; димиристоилфосфатидилхолин – ДМФХ; дифференциальная сканирующая микрокалориметрия – ДСК; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; фосфолипидные мультиламеллярные липосомы – ФМЛ; свободные жирные кислоты – СЖК; сывороточный альбумин человека – САЧ; клетки асцитной карциномы Эрлиха – АКЭ; саркоплазматический ретикулум – СР; фрагменты саркоплазматического ретикулума – ФСР.

Экспериментальными объектами в настоящей работе были мембранные объекты разного организационного уровня. Это позволило получить зависимости воздействия экзогенных биологически активных веществ как от их концентрации в водных растворах и в мицеллярных суспензиях, так и от участия эндогенных факторов в условиях экспериментов. Водные растворы мелафена (регулятора роста растений), феноксана – калиевой соли антиоксиданта фенозана, водные суспензии кофеина и его аналогов, водно-этанольные суспензии гидрофобизованных производных фенозана – гибридных антиоксидантов ИХФАНов (потенциальных нейтропротекторов), применяли в широком диапазоне концентраций, как больших, так и малых и сверхмалых. На рисунке 1 представлены структурные формулы примененных экзогенных веществ. Мелафен, фенозан, феноксан, ИХФАНы – синтетические вещества, созданные в ИОФХ им Арбузова РАН (Казань) и в ИБХФ РАН (Москва) [1-3]. Природные вещества: кофеин и его аналоги теофиллин и теобромин – метилксантины из группы органических соединений – метильных производных ксантина (3,7-дигидропури-2,6-диона). Эти алкалоиды, широко распространенные в растениях, являются известными пищевыми и фармакологическими регуляторами физиологически важных процессов. Помимо перечисленных экзогенных веществ в условиях экспериментов применялись эндогенные вещества, характерные для объектов животного происхождения: свободные жирные кислоты (СЖК), сывороточный альбумин человека (САЧ), неорганические соли Mg^{2+} и Ca^{2+} .

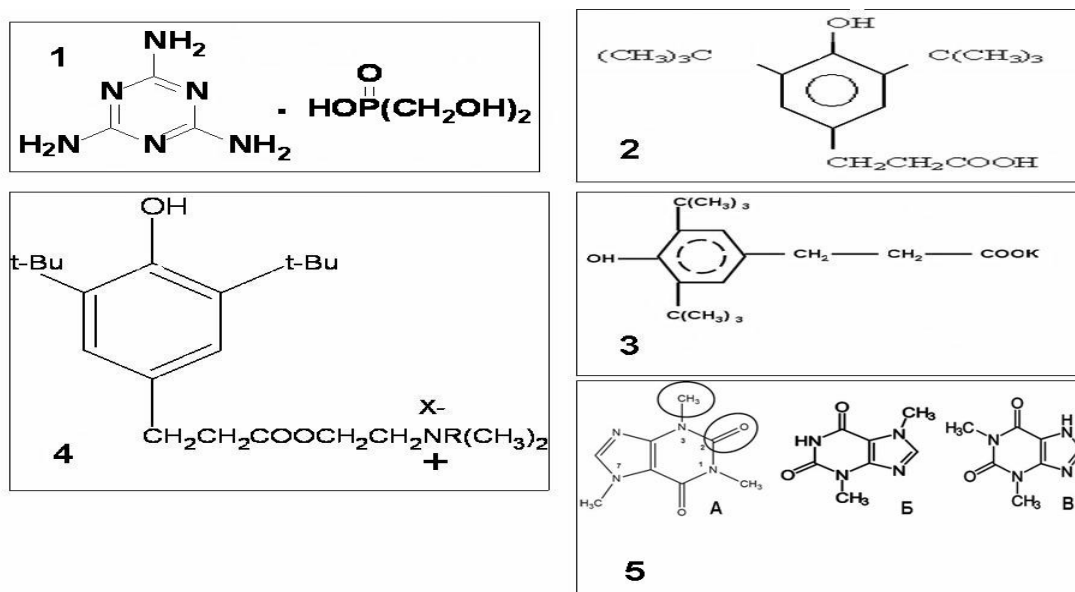


Рисунок 1. Структурные формулы примененных биологически активных веществ. **1.** Мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты); **2.** Фенозан (β -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота); **3.** Феноксан (β -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионат калия); **4.** ИХФАНЫ сложноэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил -4-гидроксифенилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов. Где (C8) R = C₈H₁₇; (C10) R = C₁₀H₂₁; (C12) R = C₁₂H₂₅; (C16) R = C₁₆H₃₃; X = Br-; **5.** Метилксантины (A) – кофеин (1,3,7-триметилксантин); (Б) – теобромин (3,7-диметилксантин); (B) – теофиллин (1,3-диметилксантин)

Выбор последовательного ряда мембранных объектов животного происхождения обусловлен необходимостью уточнения основных мишеней для воздействия БАВ. Исследования на объектах разного организационного уровня позволяют увидеть эффект при действии БАВ на структуру и функции компонентов мембран. На рисунке 2 представлены схемы экспериментальных объектов: **1** – фосфолипидные мультимембранные липосомы (ФМЛ) с окружающими гидрофобными и гидрофильными веществами; **2** – тень эритроцита с указанными белковыми компонентами плазматической мембраны – оболочки эритроцита, и внутриклеточного цитоскелета; **3** – электронная микроскопия везикул трех фракций ФСР, полученных при дифференциальном центрифугировании; **4** – схема сократительного аппарата и саркоплазматического ретикулума в скелетно-мышечном волокне.

Необходимо отметить, что ФМЛ имеют многослойную структуру, состоящую из замкнутых бислоев липосом, убывающих по размеру и вложенных друг в друга. Такая структура характерна для ФМЛ, сформированных, как из синтетического индивидуального фосфолипида ДМФХ, так и из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина [4, 5]. ДМФХ – нейтральный фосфолипид. Его молекулы имеют цилиндрическую форму. Смесь природных фосфолипидов яичного лецитина в основном представлена фосфодитилхолином, фосфатидилэтаноламином, и в малых количествах фосфатидилинозитолом и сфингохолином. Липиды имеют разные заряды и форму молекул, поэтому образуют устойчивый бислой, выровненный по зарядам и пространственно подходящим друг к другу молекулам. В состав молекул фосфолипидов входят полярные группы: холин, этаноламин, инозит, и жирнокислотные остатки разной величины и степени насыщенности. Эти фосфолипиды содержатся во всех мембранах клеток животного происхождения, составляя основу структурного обеспечения целостности мембран, а также и функционального обеспечения деятельности мембранных компонентов. Функционирование мембранных белков: рецепторов, каналов, ионных обменников, насосов и ферментов, регулируется составом липидного окружения. Белки преимущественно взаимодействуют с цвиттерионным фосфатидилхолином – электронейтральной молекулой, имеющей и положительный и отрицательный заряды. Жидкостность липидной фазы определяет конформационные флуктуации белков, необходимые для функционирования. Толщина мембраны, определяемая длиной жирнокислотных цепей и величиной фосфолипидных головок в молекулах фосфолипидов, контролирует работу встроенных в мембрану белков. Ca²⁺-АТФазы из семьи SERCA меняют сродство к лигандам в зависимости от толщины мембраны. Заглубление или выход на поверхность мембранных петель с лиганд-связывающими центрами регулируют активность работы этого Ca²⁺-насоса. Ca²⁺-АТРаза саркоплазматического ретикулума (основного Ca²⁺-депо в мышечной клетке) окружена фосфатидилэтаноламином с конической формой молекулы. Это позволяет липиду образовывать гексагональную фазу, что важно при фрагментации мембран. Также фосфатидилэтаноламином окружены и внедряющиеся ассоциированные G-белки [6], участвующие в метаболотропных сигнальных путях – проводящие сигналы от рецепторов с внешней поверхности плазмалеммы к цитоплазматическим ферментам.

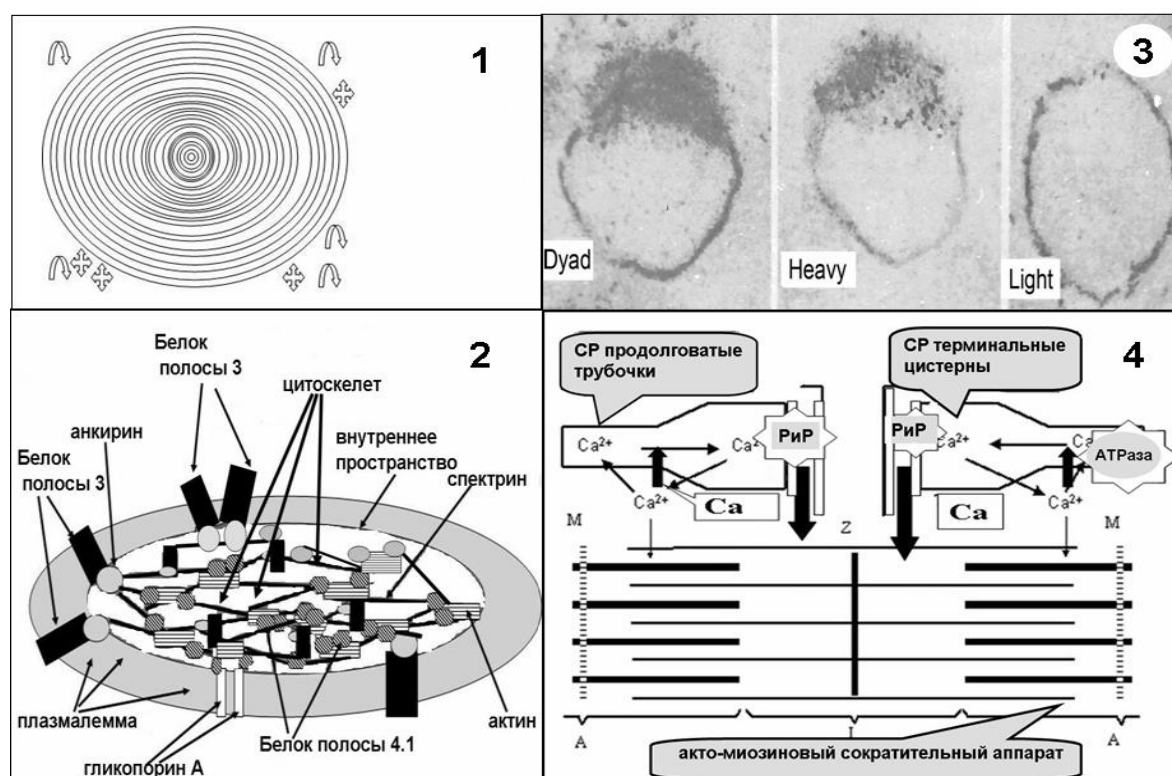


Рисунок 2. Объекты для исследования воздействия БАВ. 1. Схематическое изображение ФМЛ; 2. Тень эритроцита; 3. Электронная микроскопия везикул трех фракций ФСР, полученных при дифференциальном центрифугировании. (Dyad) – ФСРтц, полученные из терминальных цистерн, приближенных к Т-трубочкам, со значительными остатками материала Т-трубочек; (Heavy) – ФСРтц, полученные из терминальных цистерн; (Light) – ФСРпт, полученные из продолговатых трубочек [10]; 4. Схема расположения акто-миозинового сократительного аппарата с окружающими его отделами СР – продолговатыми трубочками и терминальными цистернами, указаны РнР и АТРаза, встроенные в мембраны СР и регулирующие потоки Ca^{2+}

ФМЛ, сформированные из индивидуального ДМФХ, использовались для экспериментов, проводимых методом ДСК, ФМЛ из яичного лецитина – только для измерений методом МУРР. Получали ФМЛ из ДМФХ или из яичного лецитина следующим образом. При гидратации тонких высушенных под аргоном пленок фосфолипида, растворенного в хлороформе, при интенсивном встряхивании в водной среде фосфатного буфера (рН 7,2), при температуре выше фазового перехода образуются ФМЛ. Концентрированная взвесь ФМЛ хранится при температуре 4-10 град. С°, перед ДСК измерениями разводится фосфатным буфером. К образцам 0,9 мл разбавленной суспензии ФМЛ добавляется 0,1 мл тестируемого вещества. Перед МУРР измерениями, напротив образцы концентрировались при центрифугировании. Водные растворы гидрофильных мелафена и феноксана и суспензии гидрофобного ИХФАНов готовились из концентрированных водных или этанольных растворов путем последовательного разбавления при интенсивном перемешивании с помощью «Vortex».

Отметим также, что проникновение гидрофобного вещества во всю структуру многослойных ФМЛ происходит по механизмам, характерным для мембранотропных веществ. Но гидрофильные вещества также проникали во всю толщу ФМЛ из-за образования при изменении температуры короткоживущих наноразмерных пор [7].

При ДСК плавлении ДМФХ в структуре ФМЛ виден только 1 ярко выраженный пик основного термоиндуцированного перехода при всех добавках феноксана или мелафена. И в зависимости от концентрации добавленного вещества изменяются параметры перехода. Однако кардинально большого уширения пика основного перехода не происходит. Это указывает на то, что плавление всей толщи ФМЛ происходит по механизму кооперативного изменения фазового состояния бислоя.

Следующий модельный объект, представленный на рисунке 2, – это тень эритроцита. Суспензию теней эритроцитов получали при осмотическом шоке изолированных из крови эритроцитов и последующем отмывании теней от высвободившегося гемоглобина при дифференциальном центрифугировании. Поддерживали холодовой режим 4°C [8, 9]. При ДСК тестировании действия гидрофобного ИХФАН-10, это вещество добавляли в процессе получения теней эритроцитов, мелафен и феноксан добавляли непосредственно перед ДСК измерениями.

Фрагменты органелл скелетно мышечных клеток также представлены на рисунке 2. На фотографиях электронной микроскопии везикулы трех фракций ФСР, полученные из разных отделов ретикулума при дифференциальном центрифугировании. Видны 2 типа фрагментов терминальных цистерн – везикулы ФСР с

электронно-плотным материалом ассоциированных фрагментов Т-трубочек и с ассоциированными фрагментами плазматической мембраны, и ФСР свободные от остатков других мембран - фрагменты продолговатых трубочек [10]. Взаимное расположение этих компонентов скелетно мышечного волокна отражено на схеме сократительного аппарата и саркоплазматического ретикулума. Указаны Ca^{2+} -АТРаза и рианодинорный рецептор (РиР). РиР освобождает из ретикулума ионы Ca^{2+} в цитоплазму клетки, Ca^{2+} -АТРаза выполняет функцию Ca^{2+} -насоса, закачивающего ионы Ca^{2+} во внутреннее пространство ретикулума. При этом происходит цикл сокращения-расслабления акто-миозинового комплекса. Радиографическим методом показано, что ионы Ca^{2+} закаченные Ca^{2+} -насосом продолговатых трубочек СР проходят в терминальные цистерны, где сохраняются до освобождения через Ca^{2+} -каналы [11]. На препаратах ФСР изучали влияние БАВ на функционирование Ca^{2+} -АТРаза и РиР. Методом рН-метрии измеряли закисление экспериментальной среды при гидролизе АТФ, сопряженном с закачиванием ионов Ca^{2+} в люменальное пространство ретикулума. Основным действующим веществом для исследования функционирования ФСР был метилксантин кофеин. Для кофеина издавна на мышечных препаратах было показано, что он вызывает контрактуру, подобную естественной контрактуре [12]. Известно, что основной мишенью является РиР, также определены центры взаимодействия с кофеином [13]. Показано, что ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} в значительной степени регулируют работу, как Ca^{2+} -АТРАЗы, так и РиР [14, 15]. Взаимодействие Ca^{2+} -АТРАЗы и РиР регулируется градиентом и перемещениями ионов Ca^{2+} в отделах ретикулума [16].

На рисунке 2 не показаны последующие экспериментальные объекты – изолированные клетки: эритроциты и клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). На этих объектах было протестировано влияние феноксана, мелафена и ИХФАН-10 на каналные функции мембран.

Наиболее простыми и удобными в приготовлении и хранении экспериментальными объектами являются фосфолипидные липосомы. Методом ДСК были определены термоиндуцированные параметры плавления ДМФХ в присутствии мелафена, феноксана в широком диапазоне концентраций и ИХФАН-10 в средних концентрациях. Также методом ДСК были определены изменения в организации белковых микродоменов в телях эритроцитов при действии фенозана, мелафена и ИХФАН-10. Было обнаружено, что мелафен не меняет организацию белковых микродоменов в телях эритроцитов, ИХФАН и фенозан в зависимости от концентрации значительно меняли, как температуру максимума основного термоиндуцированного перехода, так и состав микродоменов. ИХФАН-10 вызывал слияние пиков переходов микродоменов. Напротив, ДСК измерения, проведенные на менее устойчивых экспериментальных объектах – ФМЛ, показали, что мелафен в широком диапазоне концентраций значительно менял организацию фосфолипидных микродоменов в условиях различных скоростей плавления. Фенозан и ИХФАН-10 в больших концентрациях вызывали исчезновение пика основного перехода. Данные представлены на рисунке 3.

Методом малоуглового рентгеновского светорассеяния (МУРР) показали отсутствие влияния мелафена в широком диапазоне концентраций (10^{-21} М, 10^{-18} М, 10^{-12} М, 10^{-6} М) на структурные параметры ФМЛ,

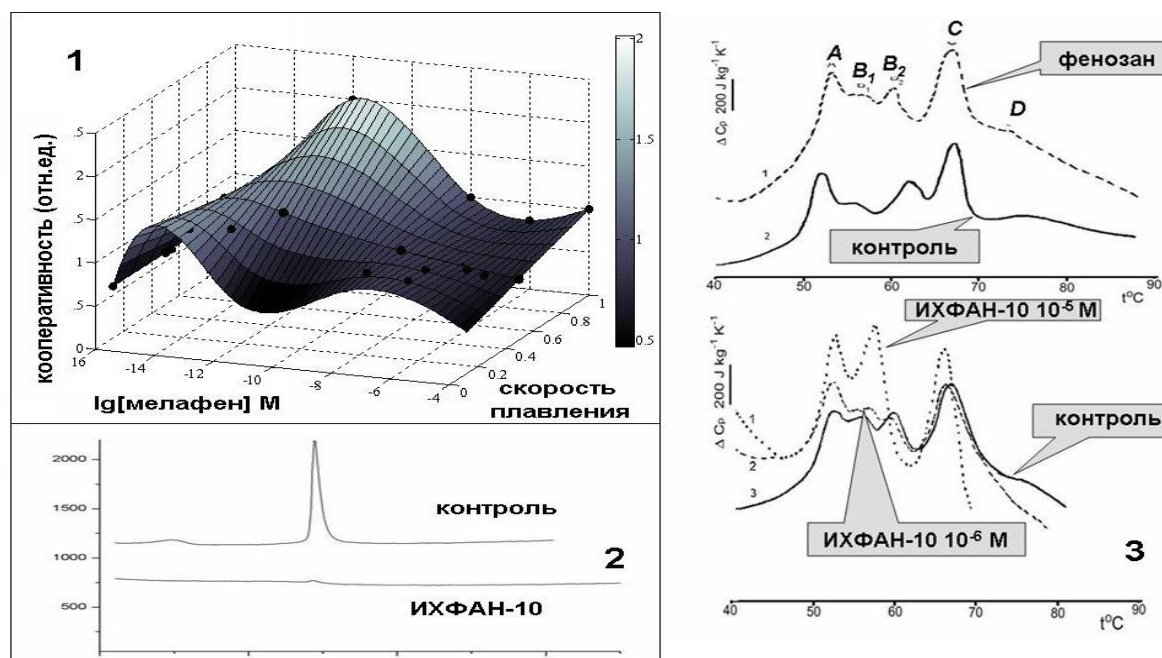


Рисунок 3. Влияние мелафена, фенозана и ИХФАН-10 на термодинамические параметры ФМЛ, сформированных из ДМФХ, и телей эритроцитов. 1. График зависимости кооперативности основного термоиндуцированного перехода ДМФХ от концентрации мелафена и скоростей плавления. 2. ДСК термограммы плавления ДМФХ в контроле и в присутствии ИХФАН-10 (10^{-6} М). 3. Кинетические кривые термоденатурации белковых микродоменов телей эритроцитов в присутствии фенозана и ИХФАН-10

сформированных из природных фосфолипидов яичного лецитина. Все полученные дифрактограммы были подобны контрольным. Присутствие растворов мелафена не оказало воздействия на порядок упаковки бислоев и толщины бислоев в ФМЛ, сформированных из смеси природных фосфолипидов (данные на рисунке не представлены). Были получены данные о толщине бислоев и порядке их упаковки в составе ФМЛ с расстояниями между бислоями, равными, соответственно, 4 нм и 6,9 нм.

Следующим экспериментальным объектом были внутриклеточные органеллы - саркоплазматический ретикулум (СР), являющийся основным Ca^{2+} -депо в смешанных скелетных мышцах теплокровных животных. Фракции фрагментированного СР (ФСР), представляющие собой фрагменты продолговатых трубочек и терминальных цистерн, сохраняют все характерные свойства этих отделов СР. Поэтому являются простыми в получении и хранении объектами. Основным эффектором воздействия на ФСР в нашей работе был метилксантин кофеин. Аналоги кофеина – теобромин, теофиллин, вызывают освобождение ионов Ca^{2+} по такому же механизму, как и кофеин. Они обладают такими же действующими группами, как и кофеин. Поэтому встраиваются в молекулу рианодинного рецептора (РиР), вызывая открывание Ca^{2+} -канала.

На рисунке 4 представлены данные о влиянии кофеина и блокаторов эффекта кофеина: прокаина, тетракаина и рутениевого красного на эффективность аккумуляции ионов Ca^{2+} фрагментами СР – двумя фракциями ретикулума.

Видно, что кофеин значительно снижает эффективность аккумуляции ионов Ca^{2+} . Кривая закисления среды не выходит на плато, так как АТФ-аза продолжает закачивать ионы Ca^{2+} во внутреннее пространство ретикулума, а кофеин в то же время постоянно открывает Ca^{2+} -канал рианодинного рецептора, и Ca^{2+} выходит из ретикулума. АТФ-аза, работа, которой регулируется концентрацией Ca^{2+} внутри ретикулума и снаружи, не блокируется низкими концентрациями ионов Ca^{2+} внутри ФСР. Однако, при добавлении блокаторов освобождения ионов Ca^{2+} , инициированного кофеином, кинетические кривые гидролиза АТФ (закисления среды измерения) приобретают вид контрольных. Так было показано сопрягающее действие мидокалма, это фармакологически активное вещество также останавливало проявление эффекта кофеина.

Однако, помимо выяснения роли экзогенных БАВ в процессах функционирования Ca^{2+} -депо СР, необходимо было исследовать роль эндогенных факторов. Для этого провели, как насыщение мембран ФСР свободной жирной кислотой (СЖК), так и удаление СЖК, имеющихся в мембранах ретикулума. Это удаление проводили в результате инкубации ФСР с сывороточным альбумином человека (САЧ), освобожденным от лигандов. Было

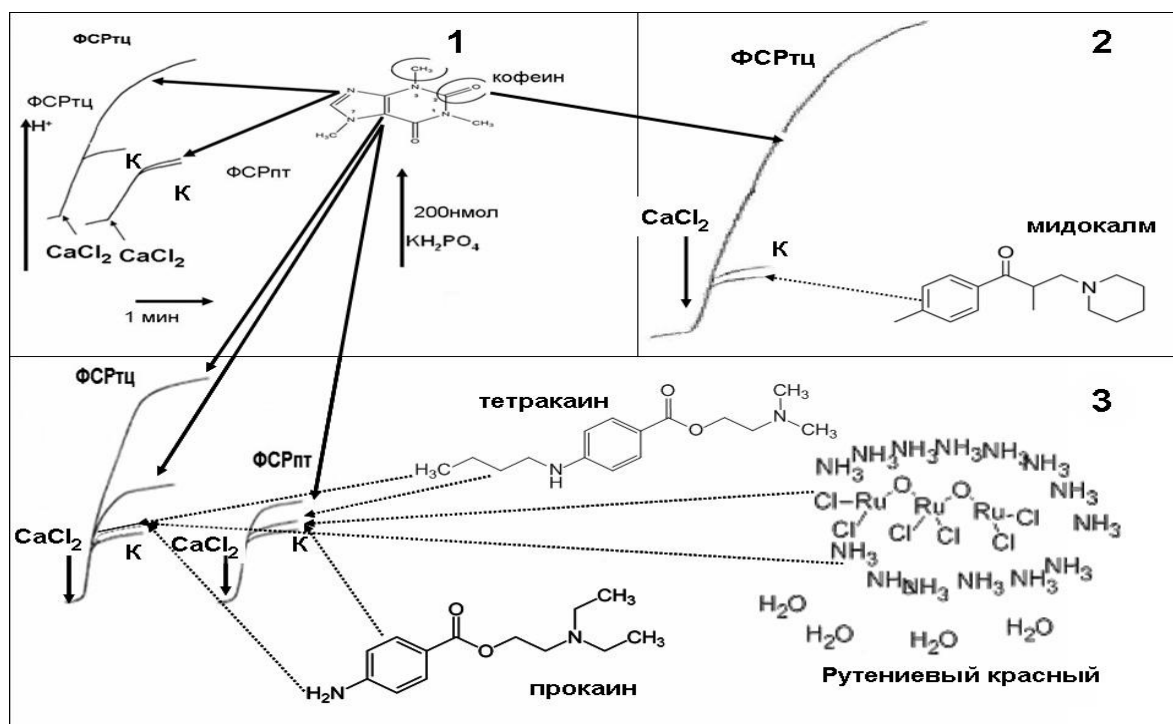


Рисунок 4. Кинетические кривые закисления экспериментальной среды при гидролизе АТФ фрагментами СР. 1. Влияние 5 мМ кофеина на ФСРтц и ФСРпт. Отмечены значимые для проявления эффекта кофеина и его аналогов на освобождение Ca^{2+} из ФСРтц боковые группы –карбонильная в положении 2 и метильная в положении 3. 2. Влияние на ФСРтц 5 мМ кофеина; 5 мМ кофеина + 10 мМ мидокалма. 3. Влияние на ФСРтц и ФСРпт 10 мМ кофеина; 5 мМ кофеина; 5 мМ кофеина + 0,2 мМ тетракаина; -5 мМ кофеина + 3мкМ рутениевого красного; -5 мМ кофеина + 10 мМ прокаина. Обозначения: воздействие кофеина указано сплошными стрелками; воздействие блокаторов эффекта кофеина – пунктирными стрелками; контрольные кинетики – буквой К; инициирование АТФ-азной реакции расщепления АТФ и закачивания ионов Ca^{2+} – стрелками и CaCl_2

обнаружено, что значительно повышается пассивная проницаемость мембран ФСР для ионов Ca^{2+} , поддержание градиента Ca^{2+} через мембрану ФСР снижается, что увеличивает эффект кофеина на ФСР и снижает эффективность транспорта ионов Ca^{2+} . Напротив, экстракция СЖК приводила к улучшению эффективности аккумуляции Ca^{2+} . Эффекты контролировались изменениями концентрации ионов Mg^{2+} . При концентрации 2мМ наблюдали экстремум.

Изучение воздействий БАВ на РиР и АТФазу в ФСР позволяет получить информацию о возможности регуляции функционирования Са депо. В работе Кудряшова М. с соавтором [17] показано, что активация РиР изменяет кривизну и толщину мембраны ФСР, что может быть фактором регуляции активности АТФ-азы. Для АТФ-азы семьи SERCA важны толщина окружающей их мембраны и ее липидный состав, так как это регулирует доступность центров, связывающих лиганды.

С применением спектральных методов было показано влияние тестируемых веществ на каналные функции клеток – эритроцитов, изолированных из крови теплокровных животных, и клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). В клетках были задействованы Ca^{2+} -зависимые каналы. В эритроцитах ИХФАН-10 увеличивал проницаемость мембраны для гемоглобина и утечку ионов K^+ через Ca^{2+} -зависимые каналы. В клетках АКЭ происходило изменение клеточного объема при активации Ca^{2+} -зависимых K^+ и Cl^- -каналов.

Асцитная карцинома Эрлиха перевивалась мышам и через 7-8 суток клетки изолировались из асцитной жидкости, отмывались и проводилось измерение влияния БАВ на Ca^{2+} -сигнальную систему. Активировали пуриновую метаболитную систему. Все звенья проведения сигнала от поверхности клетки до ответов были ранее идентифицированы ингибиторным анализом [18, 19]. На рисунке 5 представлены схема метаболитной передачи сигнала с поверхности клетки до внутриклеточного эндоплазматического ретикулума и кинетическая кривая светорассеяния суспензии клеток АКЭ при активации пуриновой метаболитной системы.

Методом первичного светорассеяния под прямым углом в видимой области показано, что на клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мелафен и феноксан, примененные в широком диапазоне концентраций, действуют через угнетение Ca^{2+} -сигнальных путей, как метаболитного, так, вероятно, и неметаболитного, опосредованного активацией канала SOC (store operated channel), регулируемого опустошением Ca^{2+} -депо эндоплазматического ретикулума.

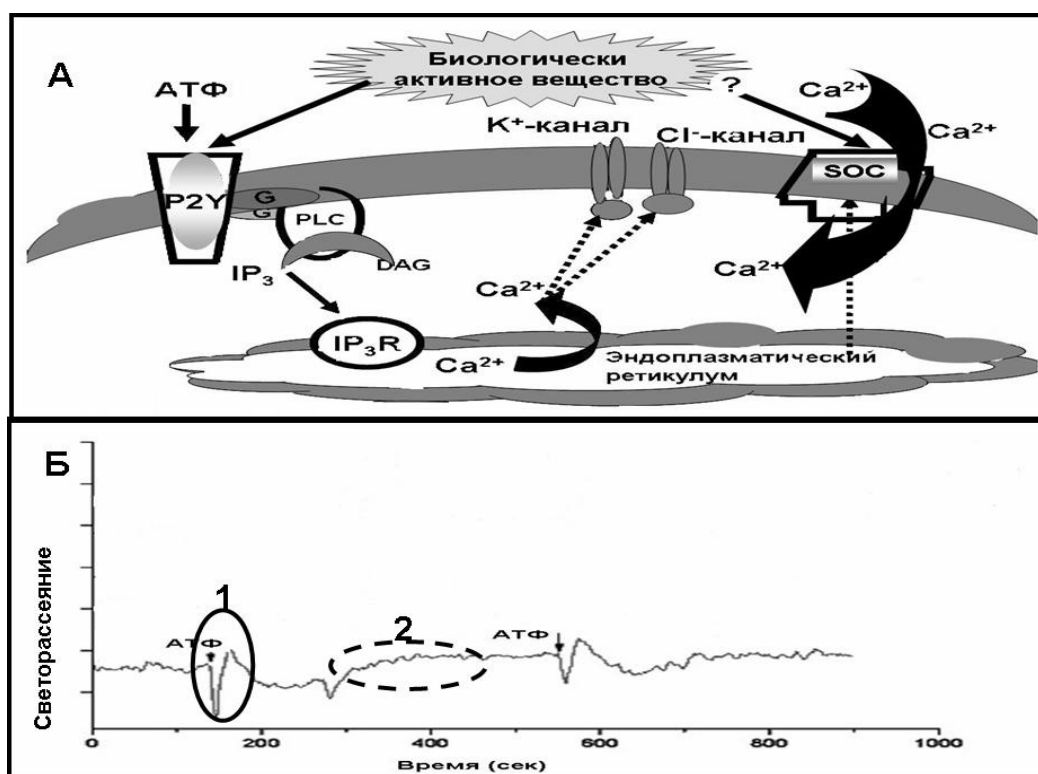


Рисунок 5. Действие БАВ на Ca^{2+} -сигнализацию в изолированных клетках АКЭ. А – Схема метаболитной передачи сигнала с поверхности клетки до внутриклеточного эндоплазматического ретикулума. Указаны: P2Y-метаболитные пуриновые рецепторы; G – белки; PLC – фосфолипаза C; DAG – диацилглицерол; IP₃ – инозитолтрифосфат; IP₃R – инозитолтрифосфатный рецептор; K⁺-канал; Cl⁻-канал; SOC – store operated channel – канал регулируемый опустошением Ca^{2+} -депо эндоплазматического ретикулума; Ca^{2+} -поток. Б – Кинетическая кривая светорассеяния суспензии клеток АКЭ при активации пуриновой метаболитной системы. Указаны: добавки АТФ; овалами отмечены пики увеличения светорассеяния суспензии клеток АКЭ. 1 – сплошной линией отмечен 1-й клеточный ответ, 2 – прерывистой линией отмечен второй клеточный ответ

На основании данных, полученных с представленными экспериментальными объектами, методами их исследования был сделан вывод о возможности использования примененных методов и экспериментальных объектов для тестирования веществ с целью выявления их биологической активности.

Список литературы / References:

1. Фаттахов С.-Г.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис гидроксиметил фосфиновой кислоты (Мелафен), как новый сильный регулятор роста растений. *13 Международная конференция химии фосфорных соединений*. С.-Петербург, 2002, с. 80. [Fattakhov S.G., Reznik V.S., Kononov A.I. Melamine Salt of Bis (hydroxymethyl) Phosphinic Acid (Melaphene) as a New Generation Regulator of Plant Growth Regulator. *Proceedings of the 13th International Conference on Chemistry of Phosphorus Compounds*, 2002, St. Petersburg, p. 80. (In Russ.)].
2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. *Пространственно- затруднённые фенолы*. М.: Химия, 1972, 352 с. [Ershov V.V., Nikiforov G.A., Volodkin A.A. *Spatially obstructed phenols*. Moscow: Khimia, 1972, 325 p. (In Russ.)]
3. Никифоров Г.А., Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. Биоантиоксиданты "поплавкового" типа на основе производных 2,6 дитретбутил-фенола. *Биоантиоксидант. Научный вестник мед. акад.*, 2003, с. 50-51. [Nikiforov G.A., Belostotskaya I.S., Vol'eva V.B., Komissarova N.L., Gorbunov D.B. Bioantioxidants "float types" at base of derivatives 2,6 ditret butyl fenyl. *Scientific Bulletin of the Tyumen Academy of Medicine: «Bioantioxidants»*, 2003, vol. 1, pp. 50-51. (In Russ.)]
4. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидрокверцитинга) с мультиламеллярными липосомами из димиристоилфосфатидилхолина. *Биофизика*, 2008, т. 53, № 1, с. 78-84. [Tharachovsky Yu.S., Kuznetsova S.M., Vasil'eva N.A., Egorochkin M.A., Kim I.A. Interaction of taxifolin (dihydroquercetin) with dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar liposomes. *Biofizika*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 78-84. (In Russ.)]
5. Тараховский Ю.С. *Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ*. М.: Издательство ЛКИ, 2011, 280 с. [Tharachovsky Yu.S. *Intellectual lipid nanocontainers in targeted drug delivery*. LKI, Moscow, 2011, 280 p. (In Russ.)]
6. Escriba P.V., Ozaita A., Ribas C., Miralles A., Fodor E., Farkas T., Garcia-sevilla J.A. Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar – prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A*, 1997, vol. 94, pp. 11375-11380.
7. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. *Липидные мембраны при фазовых превращениях*. М.: Наука, 1992, 125 с. [Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. *Lipid Membrane in Phase Transformations*. Moscow, Nauka Publ., 1992, 125 p. (In Russ.)]
8. Sato Y., Yamakose H. Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, vol. 16, no. 5, pp. 506-512.
9. Akoev V.R., Matveev A.V., Belyaeva T.V., Kim Y.A. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. *Biochim Biophys Acta.*, 1998, vol. 1371, no. 2, pp. 284-294.
10. Алексеева О.М., Кременцова А.В., Голощапов А.Н., Ким Ю.А. Ингибиторы рианодиновых рецепторов в саркоплазматическом ретикулеуме. *Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»* Пущино 2019, с. 203-208. [Alekseeva O.M., Krementsova A.V. Goloshchapov A.N., Kim Yu.A. Inhibitors of Ryanodine receptors at sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of International Conference «Receptia I vnutriketchnaya signalizacia»*. Puschino, Moscow region, 2009, pp. 203-208. (In Russ.)]
11. Winegrad S. Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 1965, vol. 48, pp. 455-479.
12. Gebert G. Caffeine contracture of frog skeletal muscle and of single muscle fibres. *American J. of Phisol.*, 1968, vol. 215, no. 3, pp. 296-298.
13. Murayama T., Ogawa H., Kurebayashi N., Ohno S., Horie M., Sakurai T. A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca^{2+} sensitivity. *Communications Biology*, 2018, vol. 1, pp. 98.
14. Zafar S., Hussain A., Liu Y., Lewis D., Inesi G. Specificity of ligand binding to transport sites: Ca^{2+} binding to the Ca^{2+} transport ATPase and its dependence on H^{+} and Mg^{2+} . *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, vol. 476, no. 1, pp. 87-94.
15. Laver D.R. Regulation of the RyR channel gating by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Biophys. Rev.*, 2018, no. 4, pp. 1087-1095.
16. Ikemoto N., Yamamoto T. The luminal Ca^{2+} transient controls Ca^{2+} release/re-uptake of sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 279, pp. 858-863.
17. Chen W., Kudryashev M. Structure of RyR1 in native membrane. *Second Russian international conference "Cryo-electron microscopy. 2019: achievements and prospects"* Lomonosov Moscow State University (MSU) June 2-5, 2019, pp. 36-37.
18. Arslan P., Di Virgilio F., Betzame M., Tsien R.I., Pozzan T. Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, no. 5, pp. 2719-2727;
19. Замай А.С., Замай Т.Н. Влияние АТФ на асцитные клетки в разные фазы опухолевого роста. *Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация»*. Пущино. 2005, с. 48-51. [Zamai A.C.,

Zamai T.N. ATP influences to the ascetic cells at different phases of its development. *Proceedings of the International Conference on "Reception and intracellular signalling"* Pushchino, 2005, pp. 48-51. (In Russ.)]

20. Зинченко В.П., Касымов В.А., Ли В.В., Каймачников Н.П. Ингибитор кальмодулина R24571 индуцирует кратковременный вход Ca^{2+} и импульсную секрецию АТФ в клетках асцитной карциномы Эрлиха. *Биофизика*. 2005, т. 50, вып. 5, с. 1055-1069. [Zinchenko V.P., Kasimov V.A., Li V.V., Kaimachnikov N.P. Inhibitor of kalmodulin R24571 induces the transition entering of Ca^{2+} and impulse secretion of ATP at the cells of Erlich ascetic carcinoma. *Biophisika*, 2005, vol. 50 (5), pp. 1055-1069. (In Russ.)]

MODEL MEMBRANE'S OBJECTS FOR INVESTIGATIONS OF THE ENDOGENOUS AND EKZOGENOUS FACTORS ACTIONS.

Alekseeva O.M.¹, Krementsova A.V.¹, Krivandin A.V.¹, Shatalova O.V.¹, Golochshapov A.N.¹, Kim Yu.A.²

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences

Kosygina st., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: olgavek@yandex.ru

² Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

Pushchino, Russia

Abstract. For investigation of biologically active substance (BAS) effects the consistent number of experimental objects was used: model – multilamellar phospholipid liposomes (MPL), formed from synthetic individual phospholipid dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), and from mix of natural phospholipids of egg lecithin; organelles – fragmented sarcoplasmic reticulum (FSR) and erythrocyte's ghost (plasma membrane with cytoskeleton); cells-insulated erythrocytes and cells of Ehrlich ascetic carcinoma (EAC). The biologically active substances, which were used: at first - the exogenous substances: melafen, caffeine and its analogs and antagonists, phenosan and its derivatives; at second – endogenic substances: free fatty acids (FFA), serum albumin, ATP and inorganic salts, containing magnesium and calcium. The registration of experimental objects reactions to the actions of BAS was held by the methods: DSC, small-angle x-ray light scattering (SAXS), primary light scattering at a right angle in the visible range, potentiometric methods. The concentration regions of BAS have been determined by DSC under the application of phenoksan (10^{-5} M) and IHFANs (10^{-6} M). These regions were without the destruction of microdomain organization at bilayers of MPL, formed from DMPC. Melafen over a wide range of concentrations didn't disrupt the structure of such MPL, but caused the changes of thermodynamic parameters. IHFAN-10 and phenoksan changed the parameters of thermo-induced denaturation of protein microdomains of erythrocyte ghosts, melafen hadn't effect. SAXS didn't show of melafen influence at wide range of concentrations on the bilayers thickness and packing at natural MPL. The concentration-dependent actions of Mg^{2+} to the activities of Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -channel have been showed by potentiometric method, also with the presence of FFA in FSR membranes. FFA and Mg^{2+} influenced to the effect of Ca^{2+} -channel activator - caffeine. The extraction of FFA from FSR by the treatment with serum albumin reduced the effect of caffeine. Primary light diffusion showed the inhibition of purine-depended Ca^{2+} -signalling at EAC cells by the melafen and phenoksan. It has been concluded that the approach based on the using of these experimental methods and objects could be applied to the substances test with the aim of revealing of their biological activity.

Key words: *phospholipids, multilamellar liposomes, biology active substances, erythrocyte's ghost, erythrocyte, DSC, small-angle X-ray scattering.*

АНТИОКСИДАНТНАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ МОНОФЕНОЛОВ

Мартинovich Г.Г.¹, Мартинovich И.В.¹, Вчерашняя А.В.¹, Зенков Н.К.²,
Меньщикова Е.Б.², Черенкевич С.Н.¹

¹Белорусский государственный университет

пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, РБ; e-mail: martinovichgg@bsu.by

²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,
ул. Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630117, РФ; e-mail: lemen@centercem.ru

Поступила в редакцию: 22.07.2019

Аннотация. В работе изучено действие новых синтетических серосодержащих монофенолов на эритроциты и опухолевые клетки. Для установления дескрипторов молекулярной структуры, характеризующих биологическую активность исследуемых соединений, использовали монофенолы структурно взаимосвязанного ряда, различающиеся длиной углеводородной цепи алкилтиосульфатного заместителя, находящегося в *пара*-положении по отношению к гидроксильной группе, количеством *трет*-бутильных *орто*-заместителей и варьированием фрагмента "S-S": 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (С-13), 3-(3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-17). Показано, что исследуемые гидрофильные серосодержащие монофенолы увеличивают структурную устойчивость эритроцитов человека при окислительном гемолизе. Однако при действии антиоксиданта С-13, у которого в сравнении с другими монофенолами в *пара*-пропильном заместителе тиосульфатная группа заменена сульфатной, повышение структурной стабильности эритроцитов при окислительном гемолизе было в несколько раз меньше в сравнении с другими антиоксидантами. Обнаружена также противоопухолевая активность ряда исследуемых монофенолов в отношении клеток карциномы гортани человека. Установлено, что ключевым дескриптором структуры новых серосодержащих антиоксидантов, определяющим токсические свойства соединений в отношении опухолевых клеток, является наличие тиосульфатной группы в *пара*-пропильном заместителе соединения. Полученные результаты открывают новые возможности для развития методов противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: антиоксиданты, активные формы кислорода, эритроциты, опухолевые клетки, редокс-регуляция.

Функционирование и развитие организмов в кислородсодержащем окружении сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК), обладающих высокой биологической активностью. Показано участие АФК в регуляции широкого спектра биохимических и физиологических процессов, включая регенеративные и адаптационные процессы, дифференцировку клеток и апоптоз [1, 2]. Нарушение метаболизма АФК вызывает целый комплекс патофизиологических процессов и ответных реакций клетки, ведущих к развитию окислительного стресса. Поскольку защита клеток от повреждающего действия окислителей осуществляется многокомпонентной антиоксидантной системой, функционирование которой регулируется как на посттрансляционном уровне, так и на уровне экспрессии генов, коррекция метаболизма АФК с помощью фармакологических препаратов является сложной и до конца не решенной задачей.

Обнаружено, что многие природные и синтетические антиоксиданты, использование которых ориентировано на ингибирование известных окислительных процессов, часто не обладают ожидаемой клинической эффективностью при лечении и профилактике заболеваний, в патогенезе которых важную роль играет окислительный стресс. Поэтому поиск и разработка эффективных средств и технологий регуляции метаболизма АФК является актуальной задачей современной медицинской биофизики.

Эффективными регуляторами клеточных редокс-процессов являются природные и синтетические фенольные антиоксиданты. Несмотря на то, что структурные особенности фенолов, определяющие их антиоксидантные свойства в модельных системах, достаточно хорошо исследованы, взаимосвязь между биологическим действием фенольных препаратов и их антиоксидантными свойствами зачастую не выявляется.

Исследования структурно взаимосвязанного ряда бифункциональных фенольных антиоксидантов, содержащих разное количество *орто-трет*-бутильных заместителей, а также сульфатные и тиосульфатные группы в *пара*-алкильных заместителях, позволили выявить соединения с выраженными противовоспалительными свойствами *in vivo* [3]. Противовоспалительный эффект серосодержащих фенольных антиоксидантов в организме определяется их действием на редокс-зависимые факторы транскрипции, включая Nrf2, транскрипционная активность которого регулируется специфическим ингибитором Keap1. Фактор Nrf2 регулирует экспрессию более 500 генов, главным образом антиоксидантных ферментов и ферментов детоксикации ксенобиотиков, в промоторных областях которых содержится регуляторная последовательность антиоксидант-респонсивного элемента (ARE) [4, 5]. Выявлено, что одним из активных синтетических индукторов сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE является фенольный антиоксидант 3-(3'-*трет*-бутил-4'-

гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), содержащий тиосульфатную группу с лабильной S–S связью [3]. Обнаружено защитное действие ТС-13 при остром [6] и хроническом воспалении *in vivo* [7]. Показано также, что ТС-13 увеличивает выживаемость разных линий *Drosophila melanogaster* в условиях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂ и паракватом [8].

Вместе с тем при превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экспрессия генов, продукты которых способствуют развитию окислительного стресса. При высокой транскрипционной активности Nrf2 повышается содержание фактора транскрипции Klf9 (Kruppel-подобный фактор 9) [9]. В свою очередь, взаимодействие Klf9 с сайтами связывания ДНК изменяет экспрессию ряда белков, участвующих в регуляции метаболизма АФК, включая НАДФН-оксидазу [9]. Таким образом, фактор транскрипции Nrf2 является важным регулятором редокс-гомеостаза клеток, способным усиливать как восстановительные, так и окислительные процессы в клетках.

Нами обнаружено, что в клетках карциномы гортани человека фенольный антиоксидант ТС-13 индуцирует запрограммированную гибель клеток через митохондриально-опосредованный путь [10]. Показано также, что при действии ТС-13 наблюдается уменьшение редокс-буферной емкости, что приводит к снижению лекарственной устойчивости опухолевых клеток [11, 12]. В экспериментальной модели мышей с лимфолейкозом (Р-388) ТС-13 усиливал химиотерапевтическую активность цитостатика циклофосфана, взятого в субтерапевтической дозе, увеличивая индекс средней продолжительности жизни мышей с лейкемией со 196 до 283% по отношению к контролю [13]. При моделировании роста перевиваемой карциномы легких Льюис у мышей ТС-13 усиливал действие противоопухолевого агента доксорубина и тормозил рост опухоли [14]. Очевидно, что исследования гибридных антиоксидантов формируют основы нового направления терапии онкологических патологий с позиций коррекции редокс-баланса опухолевых клеток.

Для установления дескрипторов молекулярной структуры, характеризующих биологическую активность ТС-13, в настоящем исследовании изучено действие синтетических водорастворимых серосодержащих монофенолов структурно взаимосвязанного ряда на процессы окислительного гемолиза эритроцитов и пролиферативную активность клеток карциномы гортани человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали гидрофильные серосодержащие фенольные антиоксиданты 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-17), синтезированные в НИИ химии антиоксидантов (г. Новосибирск, Россия). Исследуемые соединения были получены из 2,6-ди-*трет*-бутилфенола по последовательности превращений, описанной ранее [15]. Используемые антиоксиданты относятся к структурно взаимосвязанному ряду соединений и различаются длиной углеводородной цепи алкилтиосульфатного заместителя, находящегося в *пара*-положении по отношению к гидроксильной группе, количеством *трет*-бутильных *орто*-заместителей и варьированием фрагмента "S–S" (рис. 1).

В качестве тест-системы антиоксидантной активности препаратов использовали эритроциты человека. Эритроциты выделяли из крови здоровых доноров. Лейкоцитарный слой и плазму крови отделяли после восьмиминутного центрифугирования при 1500 об/мин. Оставшиеся эритроциты ресуспендировали три раза в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), содержащем 10 мМ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 5 мМ D-глюкозы. Осаждение эритроцитов проводили центрифугированием при 1500 об/мин в течение 8 мин.

Влияние антиоксидантов на структурную устойчивость эритроцитов оценивали путем сравнения доли неразрушенных клеток при окислительном гемолизе в присутствии и в отсутствие исследуемых соединений. Гемолиз проводили в фосфатно-солевом буфере при температуре 37°C путем добавления хлорноватистой кислоты (HOCl) в концентрации 0,2 мМ к суспензии эритроцитов. При определении влияния антиоксидантных препаратов на гемолиз эритроцитов исследуемое соединение вводили в суспензию клеток за 5 мин до добавления

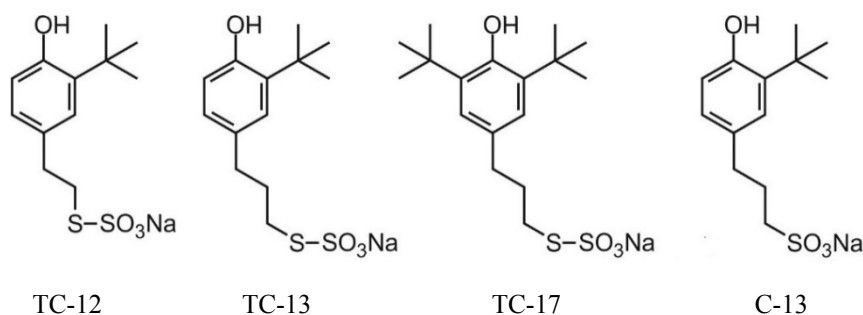


Рисунок 1. Структурные формулы гидрофильных серосодержащих фенольных антиоксидантов

НОСІ. Антиоксидантный эффект (I_A) определяли как долю неразрушенных эритроцитов, выраженную в процентах, по формуле:

$$I_A = \frac{I - I_0}{1 - I_0} \cdot 100,$$

где I – отношение оптической плотности суспензии эритроцитов после гемолиза к оптической плотности до добавления хлорноватистой кислоты в присутствии антиоксиданта; I_0 – отношение оптической плотности суспензии эритроцитов после гемолиза к оптической плотности суспензии эритроцитов до добавления хлорноватистой кислоты в отсутствие антиоксиданта. Оптическую плотность измеряли на длине волны 640 нм с использованием компьютеризированного спектрофлуориметра СМ 2203 научно-производственного центра «СОЛАР» (Минск, Беларусь).

Для оценки противоопухолевой активности соединений использовали культуру клеток эпидермоидной карциномы гортани человека линии НЕР-2. Клетки линии НЕР-2 культивировали в среде MEM (“Sigma”, USA) с добавлением 8-10 % эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (80 мг/л) в CO_2 -инкубаторе (5 % CO_2) при температуре 37 °С. Для определения влияния препаратов на пролиферативную активность опухолевых клеток исследуемое соединение в растворе объемом 5 мкл (разведение 1:1000) добавляли в чашки Петри через сутки после пересева клеток. Подсчет клеток проводили через трое суток культивирования. При оценке противоопухолевой активности препарата определяли долю выживших клеток по отношению к контролю. Полученные данные представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение среднего для 3 независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью t-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании эритроциты человека использовали в качестве специфической клеточной тест-системы, в которой отсутствует ряд мишеней действия фенолов, таких как белки митохондрий и белки сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. С целью сравнения антиоксидантных эффектов ТС-13 и структурно близких соединений изучено их действие на процессы окислительного гемолиза эритроцитов.

Показано, что ТС-13 в микромолярных концентрациях снижает скорость окислительного гемолиза эритроцитов (рис. 2а), что свидетельствует об увеличении структурной стабильности эритроцитов в присутствии антиоксиданта. С ростом концентрации ТС-13 происходит уменьшение доли гемолизированных эритроцитов (рис. 2б). Как видно из представленного вида кривой «доза-эффект» максимальное защитное действие антиоксиданта наблюдается в концентрации 100 мкмоль/л и выше. Протекторный эффект при окислительном гемолизе наблюдался также и при действии структурно близких с ТС-13 гидрофильных фенольных антиоксидантов (рис. 3).

Изменение структуры монофенольного серосодержащего антиоксиданта ТС-13 путем уменьшения длины углеводородной цепи (ТС-12), либо путем введения дополнительных метильных групп (ТС-17) не привело к значительным изменениям протекторных свойств соединений при окислительном гемолизе. Однако при действии антиоксиданта С-13, у которого в сравнении с ТС-13 в *para*-пропильном заместителе тиосульфатная группа заменена сульфатной, повышение структурной стабильности эритроцитов при окислительном гемолизе было в несколько раз меньше в сравнении с другими антиоксидантами. Таким образом, можно предположить,

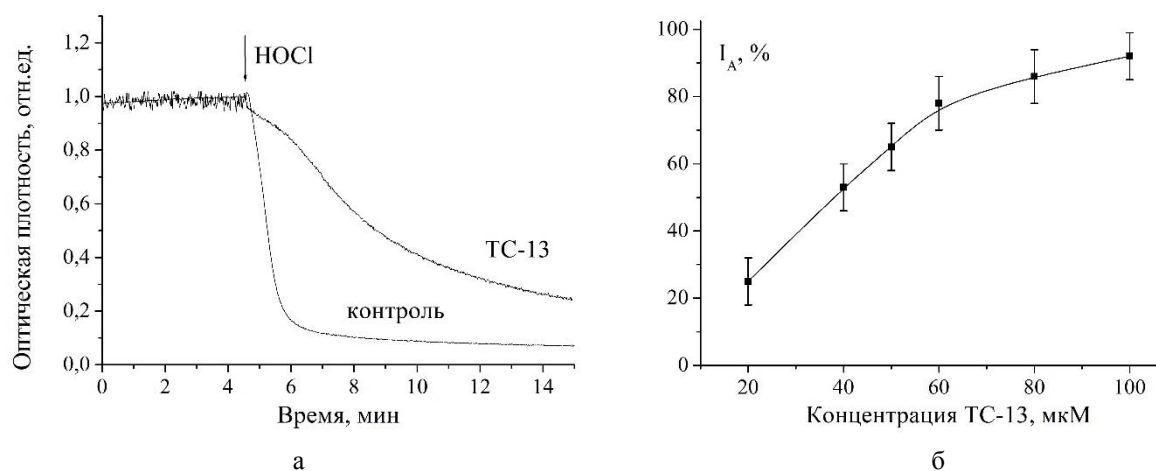


Рисунок 2. Влияние антиоксиданта ТС-13 на скорость гемолиза эритроцитов: а – концентрация антиоксиданта 20 мкМ; б – зависимость антиоксидантного эффекта ТС-13 от концентрации

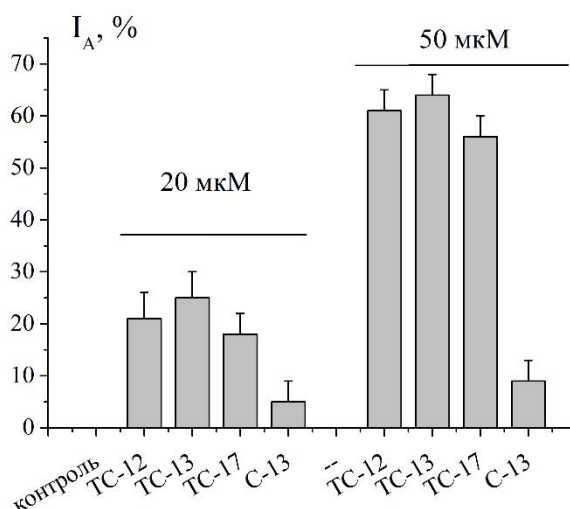


Рисунок 3. Доля негемолизированных эритроцитов в присутствии антиоксидантов

что наличие тиосульфатной группы в *para*-пропильном заместителе является одним из главных дескрипторов молекулярной структуры, определяющих эффективность действия синтетических монофенольных соединений на структурную стабильность эритроцитов.

Аналогичная зависимость биологического действия гидрофильных фенольных антиоксидантов от особенностей молекулярной структуры наблюдалась при действии на опухолевые клетки. Все исследуемые препараты, за исключением C-13, в микромолярных концентрациях приводили к снижению числа клеток в культуре (рис. 4). Гидрофильные фенольные антиоксиданты, молекулярная структура которых отличалась от TC-13 длиной углеводородной цепи (TC-12) и количеством *tert*-бутильных орто-заместителей (TC-17), проявляли более выраженное токсическое действие в отношении клеток карциномы гортани.

Таким образом, структурные особенности, определяющие противоопухолевую активность гидрофильных серосодержащих фенольных антиоксидантов, связаны с наличием тиосульфатной группы в *para*-пропильном заместителе соединения. При этом фенольные антиоксиданты, содержащие тиосульфатную группу, проявляют не только противоопухолевую активность, но также повышают структурную устойчивость эритроцитов в условиях индуцированного окислительного стресса.

Полученные нами результаты открывают новые возможности для развития методов противоопухолевой терапии. Специфичность редокс-регуляции в опухолевых клетках позволяет рассматривать антиоксиданты

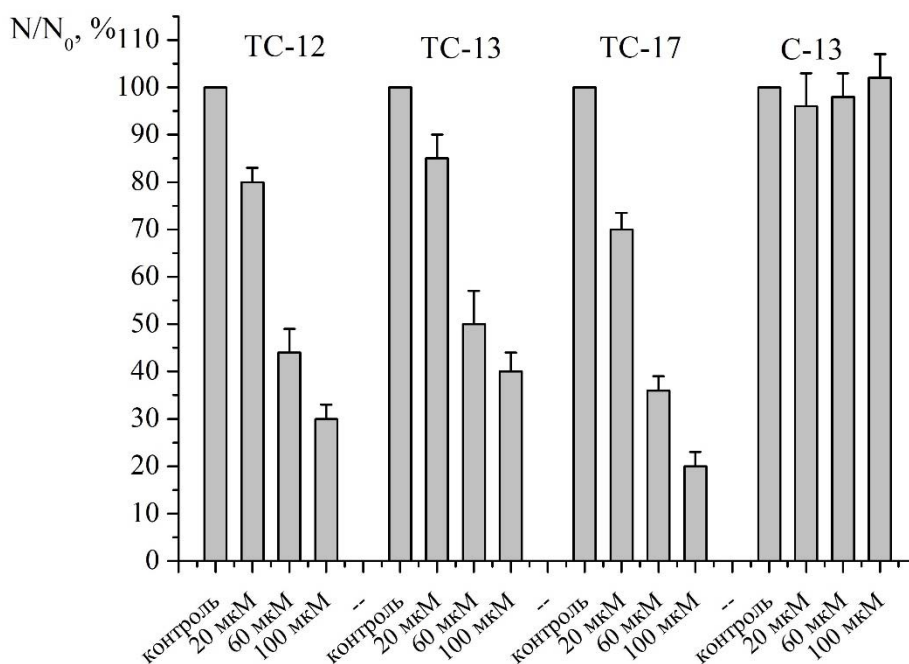


Рисунок 4. Изменение числа клеток линии HEp-2 при культивировании с антиоксидантами

направленного действия в качестве потенциальных корректоров свойств опухолевых клеток, включая их устойчивость к противоопухолевым препаратам [16]. В сравнении с другими хемосенсибилизаторами важным преимуществом монофенольных серосодержащих антиоксидантов являются протекторные свойства этих соединений, проявляемые по отношению к нетрансформированным клеткам в условиях патологии и стресса.

Список литературы / References:

1. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry*, 2001, vol. 11, no. 4, pp. 173-186. DOI: 10.1159/000047804.
2. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 2002, vol. 82, no 1, pp. 47-95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
3. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Просенко А.Е., Гусаченко О.Н., Шкляева О.А., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений. *Биохимия*, 2007, т. 72, с. 790-798. [Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Oleynik A.S., Prosenko A.E., Gusachenko O.N., Shklyayeva O.A., Vavilin V.A., Lyakhovich V.V. Antioxidant and antiinflammatory activity of new water-soluble sulfur-containing phenolic compounds. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, no. 6, pp. 644-651. DOI: 10.1134/S0006297907060077.]
4. Yamamoto M., Kensler T.W., Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. *Physiological reviews*, 2018, vol. 98, pp. 1169-1203. DOI: 10.1152/physrev.00023.2017.
5. Cuadrado A., Rojo A.I., Wells G., Hayes J.D., Cousin S.P., Rumsey W.L., Attucks O.C., Franklin S., Levonen A.L., Kensler T.W., Dinkova-Kostova A.T. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, vol. 18, pp. 295-317. DOI: 10.1038/s41573-018-0008-x.
6. Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О., Зенков Н.К., Лемза А.Е., Шаркова Т.В., Кандалинцева Н.В. Противовоспалительная активность индуцирующего систему антиоксидант-респонсивного элемента (ARE) фенольного антиоксиданта ТС-13. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2013, т. 155, с. 344-348. [Menshchikova E.B., Tkachev V.O., Zenkov N.K., Lemza A.E., Sharkova T.V., Kandalintseva N.V. Anti-Inflammatory Activity of TS-13, ARE-Inducing Phenol Antioxidant. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2013, vol. 155, no. 3, pp. 366-369. DOI: 10.1007/s10517-013-2155-8.]
7. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Лемза А.Е., Ткачев В.О., Кандалинцева Н.В. Защитное действие ARE-индуцирующего фенольного антиоксиданта ТС-13 при хроническом воспалении. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2013, т. 155, с. 305-309. [Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Tkachev V.O., Lemza A.E., Kandalintseva N.V. Protective effect of are-inducing phenol antioxidant TS-13 in chronic inflammation. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2013, vol. 155, no. 3, pp. 330-334. DOI: 10.1007/s10517-013-2146-9.]
8. Вайсман Н.Я., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Голубовский М.Д. Влияние индуцирующего антиоксидант-респонсивный элемент фенола на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*. *Успехи геронтологии*, 2011, т. 24, с. 591-600. [Vaisman N., Men'shchikova E.B., Zenkov N.K., Kandalintseva N.V., Golubovskii M.D. Effect of antioxidant responsive element inducing phenol on *D. melanogaster* life span. *Advances in gerontology*, 2011, vol. 24, no. 4, pp. 591-600. (In Russ.)]
9. Zucker S.N., Fink E.E., Bagati A., Mannava S., Bianchi-Smiraglia A., Bogner P.N., Wawrzyniak J.A., Foley C., Leonova K.I., Grimm M.J., Moparthy K., Ionov Y., Wang J., Liu S., Sexton S., Kandel E.S., Bakin A.V., Zhang Y., Kaminski N., Segal B.H., Nikiforov M.A. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9. *Molecular cell*, 2014, vol. 53, pp. 916-928. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.033.
10. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Черенкевич С.Н. Индуктор экспрессии ARE-регулируемых генов фенольный антиоксидант ТС-13 вызывает гибель опухолевых клеток через митохондриально-опосредованный путь. *Биофизика*, 2015, т. 60, № 1, с. 120-128. [Martynovich G.G., Martynovich I.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Cherenkevich S.N. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway. *Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 94-100. DOI: 10.1134/S0006350915010194.]
11. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Вчерашняя А.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Черенкевич С.Н. Регуляция химиорезистентности опухолевых клеток фенольными антиоксидантами. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, № 1, с. 411-415. [Martynovich G.G., Martynovich I.V., Vcherashniaya A.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Cherenkevich S.N. Regulation of tumor cells chemoresistance by phenolic antioxidants. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 411-415. (In Russ.)]
12. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Вчерашняя А.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Черенкевич С.Н. Механизмы редокс-регуляции химиорезистентности опухолевых клеток фенольными антиоксидантами. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 6, с. 1142-1152. [Martynovich G.G., Martynovich I.V., Vcherashniaya A.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Cherenkevich S.N. Mechanisms of redox regulation of chemoresistance in tumor cells by phenolic antioxidants. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 6, pp. 942-949. DOI: 10.1134/S000635091706015X.]
13. Богатыренко Т.Н., Кандалинцева Н.В., Сашенкова Т.Е., Мищенко Д.В. Серосодержащие фенольные антиоксиданты в повышении противоопухолевой эффективности циклофосфана и его комбинации с донором оксида азота. *Известия Академии наук. Серия Химическая*, 2018, № 4, с. 700-704. [Bogatyrenko T.N., Sashenkova T.E., Mishchenko D.V., Kandalintseva N.V. Sulfur-containing phenolic antioxidants increasing antitumor

efficiency of cyclophosphamide and its combination with nitric oxide donor. *Russian Chemical Bulletin*, 2018, vol. 67, no. 4, pp. 700-704. DOI: 10.1007/s11172-018-2125-4.]

14. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Ковнер А.В., Храпова М.В., Кандалинцева Н.В., Мартинович Г.Г. Синтетический фенольный антиоксидант ТС-13 подавляет рост перевиваемой карциномы легких Льюис и потенцирует онколитический эффект доxorубина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2018, т. 166, № 11, с. 592-597. [Men'shchikova E.B., Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Kovner A.V., Khrapova M.V., Kandalintseva N.V., Martinovich G.G. Synthetic phenolic antioxidant TS-13 suppresses the growth of Lewis lung carcinoma and potentiates oncolytic effect of doxorubicin. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2019, vol. 166, no. 5, pp. 646-650. DOI: 10.1007/s10517-019-04410-6]

15. Гайнутдинов П.И., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинович Г.Г., Хольшин С.В., Кандалинцева Н.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Обратная зависимость между антиоксидантной активностью синтетических монофенолов структурно взаимосвязанного ряда и их токсичностью в отношении опухолевых клеток. *Сибирский научный медицинский журнал*, 2018, т. 38, № 1, с. 22-31. [Gainutdinov P.I., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Martinovich G.G., Kholshin S.V., Kandalintseva N.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B. Inverse relationship between the antioxidant activity of structurally related synthetic monophenols and their toxicity in tumor cells. *Siberian Scientific Medical Journal*, 2018, vol. 38, no. 1, pp. 22-31. DOI: 10.15372/SSMJ20180104. (In Russ.)]

16. Зенков Н.К., Кожин П.М., Вчерашняя А.В., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Особенности редокс-регуляции в опухолевых клетках. *Сибирский научный медицинский журнал*, 2019, т. 39, № 9, с. 11-26. [Zenzov N.K., Kozhin P.M., Vcherashnyaya A.V., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V., Menshchikova E.B. Futures of redox regulation in tumor cells. *Siberian Scientific Medical Journal*, 2019, vol. 39, no. 2, pp. 11-26. DOI: 10.15372/SSMJ20190202. (In Russ.)]

ANTIOXIDANT AND ANTI-TUMOR ACTIVITY OF NEW SYNTHETIC SULFUR-CONTAINING MONOPHENOLS

Martinovich G.G.¹, Martinovich I.V.¹, Vcherashniaya A.V.¹, Zenkov N.K.², Menshchikova E.B.², Cherenkevich S.N.¹

¹ Belarusian State University,

Nezavisimosti Ave., 4, Minsk, 220030, Republic of Belaru; e-mail: martinovichgg@bsu.by

² Federal Research Centre fundamental and translational medicine,

Timakova St., 2, Novosibirsk, 630117, Russia; e-mail: lemen@centercem.ru

Abstract. Effects of new synthetic sulfur-containing monophenols on erythrocytes and tumor cells were studied. To establish the molecular structure descriptors characterizing the biological activity of the compounds, new synthetic structurally related water-soluble monophenols with varying length of the hydrocarbon chain of the *para*-alkylthiosulfonate substituent, the amount of *tert*-butyl *ortho*-substituents and the "S-S" fragment structure were used: sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)ethyl thiosulfonate (TS-12), sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl sulfonate (S-13), sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl thiosulfonate (TS-13), sodium 3-(3',5'-di-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl thiosulfonate (TS-17). It was shown that the studied monophenols increase the structural stability of human erythrocytes during oxidative hemolysis. However, under the action of the antioxidant C-13, in which the thiosulfonate group in the *para*-propyl substituent is replaced by the sulfonate group in comparison with other monophenols, the increase in the structural stability of erythrocytes during oxidative hemolysis was several times less in comparison with other antioxidants. It was also found the antitumor activity of several monophenols against human larynx carcinoma cells. It has been established that the key structural descriptor of new sulfur-containing antioxidants, that determine the toxic properties of compounds against tumor cells, is the presence of the thiosulfonate group in the *para*-propyl compound substituent. The obtained results provide new opportunities for the development of antitumor therapy methods.

Key words: antioxidants, reactive oxygen species, erythrocytes, tumor cells, redox regulation.

ИНСТРУМЕНТАЛЬНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Корнеев В.Н.¹, Шлектарёв В.А.², Забелин А.В.³, Ланина Н.Ф.², Толочко Б.П.⁴,
Вазина А.А.²

¹ Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ, e-mail: kvn_40@mail.ru

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

г. Пущино, РФ

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

г. Москва, РФ

⁴ ФГБУН Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН

г. Новосибирск, РФ

Поступила в редакцию: 22.07.2019

Аннотация. Рассмотрены основные компоненты инструментальных и методических разработок для исследования биологических тканей методами структурной биологии с использованием синхротронного излучения (СИ) из накопительных колец ВЭПП-3 и Сибирь-2 в Московском и Сибирском центрах коллективного пользования. Наша цель состоит в изучении механизмов структурно-функциональной устойчивости нативных и трансформированных тканей человека и животных при различных физико-химических воздействиях. Представлены возможности созданных аппаратуры и методов, а также экспериментальные данные по исследованию биологических полимеров с различной степенью упорядоченности в молекулярной и наномасштабной шкале.

Ключевые слова: синхротронное излучение, система первичных коллиматоров, рентгеновская дифракция с высоким временным разрешением.

Важная роль в изучении структурного механизма функциональной активности биологических систем принадлежит инструментальным и методическим разработкам с использованием синхротронного излучения (СИ). С момента создания российских источников СИ (ВЭПП-3 в ИЯФ СО РАН и Сибирь-2 в НИЦ «Курчатовский институт») появились экспериментальные возможности прижизненного изучения структурных основ функционирования биологических систем, обеспечивающих такие функции, как подвижность, сократимость, динамика цитоскелета, мембранный транспорт, проведение возбуждения, деление клеток, клеточная дифференциация, трансформация при старении и патологических процессах [1-3]. В этой связи решены два аспекта использования СИ для решения задач структурной биологии тканей: во-первых, проведены разработки инструментального обеспечения для исследования механизмов функционирования биологических полимеров в молекулярной и наномасштабной шкале и, во-вторых, развиты методы рентгеновской дифракции под большими (WAXS) и малыми (SAXS) углами [4-15].

Экспериментальная техника и методы исследования предназначались для проведения следующих экспериментов: исследование структуры и структурной динамики поперечно-полосатой скелетной мышцы, образцов эпителиальных тканей в норме и патологии; изучение природных и инженерных конструкций шелка, а также влияния высокочастотной электрохирургической сварки (ВЧ-сварки) на биологические ткани.

На рабочих каналах источников СИ созданы рентгеновские станции на основе методов монохроматической ($\lambda = \text{const}$) и энергетической ($\Theta = \text{const}$) дифрактометрии. На рисунке 1 приведена их обобщенная блок-схема с принципиальными отличиями для каждого метода в системах формирования пучка СИ и регистрации рентгендифракционных картин на основе позиционно-чувствительного координатного или энерго-дисперсионного детекторов [16-21].

В системе формирования пучка СИ для метода $\lambda = \text{const}$ вначале пучок коллимируется до размера входных апертур последующих рентгенооптических элементов. Далее обеспечивается монохроматизация потока с выбором перестраиваемой длины волны и его коллимация в меридиональной и сагиттальной плоскостях. В устройстве контроля за субклеточными структурами формируется канал видимого диапазона с лазерным дифрактометром, который настраивается соосно с рентгеновским потоком, что позволяет одновременно вести контроль и за субклеточными структурами в микрометровом диапазоне. Для метода $\Theta = \text{const}$ в системе формирования пучка СИ обеспечивается коллимация полихроматического потока с заданной расходимостью, размерами и ориентацией.

Полученная информация хранится и обрабатывается соответствующей системой, также имеется дистанционная система по управлению настройкой комплекса.

Таким образом, в методе $\lambda = \text{const}$ полученная дифракционная картина представляет собой распределение интенсивности как функции угла рассеяния. В методе $\Theta = \text{const}$ дифракционная картина является распределением интенсивности как функции длины волны при фиксированном угле рассеяния (Θ). Межплоскостные расстояния объекта (d_{hkl}) однозначно определяются дискретным набором энергий фотонов.



Рисунок 1. Блок-схема рентгенодифракционных станций на источниках СИ на основе методов монокроматической и энергетической дифрактометрии

Метод $\Theta = \text{const}$ обеспечивает увеличение интенсивности рентгеновского пучка на 2-3 порядка, однако в ранний период разработки первых источников СИ это преимущество было недостижимо в связи с низким быстродействием детектирующих систем. В настоящее время разработаны энерго-дисперсионные детекторы с высокой эффективностью регистрации и энергетического разрешения, поэтому весьма заманчиво использовать полихроматическое излучение.

Наиболее традиционным и отлаженным является метод $\lambda = \text{const}$, что в большей степени связано с развитием позиционно-чувствительных координатных детекторов.

На рисунке 2 представлена принципиальная схема рентгенографической камеры, созданной на основе метода энергетической дифрактометрии. На рабочем основании камеры (1) по ходу пучка СИ расположены: устройство формирования пучка (2); держатель образца (3) с механизмом его сканирования (4, 12, 13); полупроводниковый детектор (5), установленный на платформе (6) и средства ее перемещения (10) и (11). Перед детектором (5) располагается приемная щель, определяющая угол регистрации 2Θ . Пространство прохождения потока рассеянного излучения закрыто вакуумопроводом [8, 14].

Устройство формирования пучка СИ (2) (рис. 2) обеспечивает его коллимацию с заданной расходимостью, размерами и ориентацией. Выставление детектора в требуемую зону плоскости регистрации рассеянного излучения от объекта осуществляется путем вращения платформы (6) вокруг осей кронштейнов (8) и (7), что обеспечивает установку угла наблюдения в меридиональном ($2\Theta_m$) и сагиттальном ($2\Theta_s$) направлениях соответственно. Вращение осуществляют синусные механизмы (10) и (11), что позволяет отсчитывать углы наблюдения по линейной шкале.

На рисунке 3 приведены схемы рентгенодифракционной станции для метода $\lambda = \text{const}$: а) обобщенная оптическая схема; б) структурная схема. На обобщенной схеме представлены главные плоскости рентгенооптических элементов и показан ход лучей в меридиональном и сагиттальном сечениях от источника излучения (1) до его изображения на входе системы регистрации – детектора (2). Увеличение интенсивности и уменьшение размеров пучка обеспечивается его фокусировкой в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

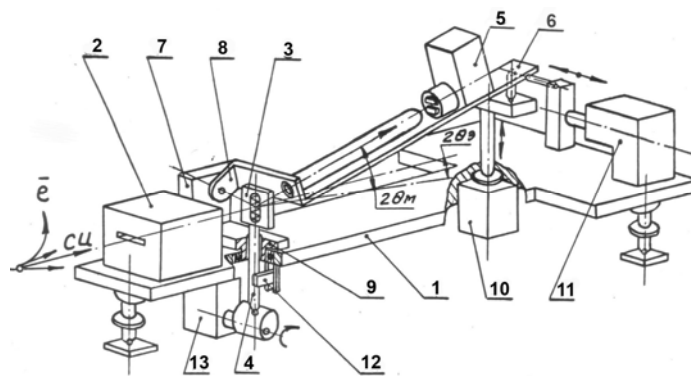


Рисунок 2. Принципиальная схема экспериментальной камеры для метода $\Theta = \text{const}$

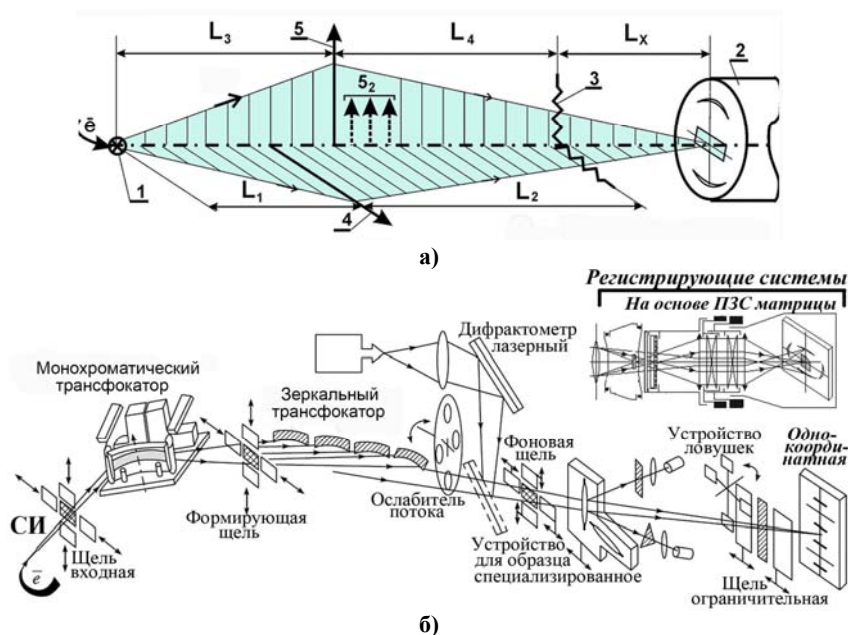


Рисунок 3. Схемы станции для метода $\lambda=\text{const}$: а) обобщенная оптическая схема и б) структурная схема

Условие плавной фокусировки обеспечено рентгенооптическими элементами, которые нами названы рентгенооптическими трансфокаторами: первый элемент – монохроматическим трансфокатором (4); второй – зеркальным трансфокатором (5). Фокусировка рентгеновского потока осуществляется за счет изгиба рентгенооптических элементов по форме кругового цилиндра переменного радиуса. Монохроматический трансфокатор (4) работает на принципе брэгговской дифракции от симметрично срезанного кристалла и обеспечивает две функции - выделение требуемой длины волны при заданной ширине спектра и фокусировку потока в сагиттальной плоскости.

Зеркальный трансфокатор (5) формирует рентгеновский поток в меридиональной плоскости и представляет полисекционную систему фокусирующих зеркал, установленных друг за другом. Каждое зеркало помещено в отдельный вакуумируемый корпус, который представляет собой самостоятельный модуль с дистанционным управлением тремя основными операциями: опусканием передней кромки зеркала на пучок СИ; поворотом зеркала на угол скольжения и изгибом зеркальной поверхности по цилиндру. Для создания светосильной полисекционной оптической системы, во-первых, необходимо настроить углы скольжения зеркал (сделанных из разных материалов) в первом τ_1 и последующих τ_n модулях в соответствии с граничными условиями. Во-вторых, необходимо создать оптимальную протяженность зеркальной поверхности исходя из угла поля зрения системы ψ_n (угол захвата пучка СИ) [5, 10, 13] и сформировать «свертку» в плоскости детектора всех изображений от каждого устройства с зеркалом. Для формирования оптимальной геометрии сечения пучка СИ и уменьшения уровня фона от рентгенооптических элементов были созданы три комплекта специализированных четырехстворчатых щелей с независимо управляемыми шторками: входная щель располагается перед монохроматическим трансфокатором; формирующая щель установлена перед зеркальным трансфокатором; фоновая щель помещается вблизи перед исследуемым образцом [15].

На схеме представлен реверсированный вариант расположения кристалла и зеркал, который был предложен нами и реализован в Сибирском центре [4, 22, 23]. Это позволило решить три основные задачи – увеличить входную апертуру пучка, уменьшить радиационные и тепловые нагрузки на зеркала, являющиеся наименее устойчивыми в радиационном отношении элементами, и выполнить условия подавления гармоник основной длины волны за счет подбора оптимального угла скольжения пучка к зеркальным поверхностям разной плотности.

На рисунке 4 представлены: схема (а) и изображение (б) одного модуля. Зеркало (1) расположено на дополнительной плите (2) с возможностью изгиба от привода (3). Плита (2) снабжена механизмом (4) для поворота относительно платформы (5) вокруг оси O_1 , с которой совмещена передняя кромка зеркальной поверхности. Платформа (5) размещена в корпусе (6) на трех телескопических опорах, причем передняя опора (7) с приводом (8) имеет шаровой скользящий контакт, а две задние опоры (9) и (10) установлены с силовым замыканием на точечные контакты O_2 и O_3 , которые расположены на линии перпендикулярно плоскости фокусировки. Опора (9) имеет ручное управление, а опора (10) снабжена приводом (11) для корректировки поперечного угла качания зеркала (1).

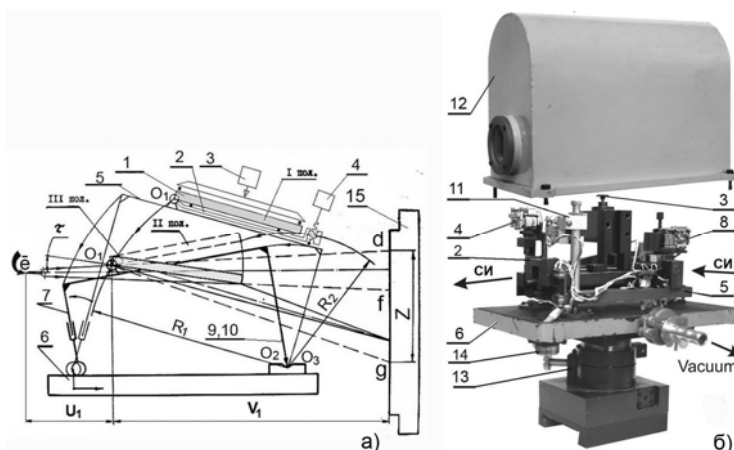


Рисунок 4. Модульный блок с фокусирующим зеркалом: схема установки зеркала на пучке СИ (а) и общий вид (б)

Корпус (6) герметично накрыт кожухом (12) с лавсановыми окнами для прохождения пучка СИ, что обеспечивает вакуумирование рабочего объема. Устройство может перемещаться механизмом (13) перпендикулярно пучку СИ в вертикальном и горизонтальном направлениях. Дистанционное управление приводами внутри рабочего объема осуществляется через вакуумный разъем (14) [5].

Методика рентгendifракционных исследований с высоким временным разрешением, так называемое «дифракционное кино», создана для решения задач по динамике структурных преобразований в процессе биологического функционирования, в первую очередь при мышечном сокращении. Были разработаны несколько версий данной методики с набором программ контроля за экспериментом, сбора и обработки полученных данных. Рентгенографическая станция оснащена системой регистрации на основе быстродействующего однокоординатного детектора ОД-3, а также специализированным устройством размещения и жизнеобеспечения портняжной мышцы лягушки во время длительного (несколько часов) рентгendifракционного эксперимента [21]. Разработана система управления исполнительными устройствами и регистрации рентгеновских и механических характеристик различных объектов (СУР), блок-схема которой представлена на рисунке 5а [24].

Представленная система управления и регистрации (СУР) позволяет с миллисекундным временным разрешением регистрировать физиологические параметры мышцы при сокращении: развиваемую силу, длину мышцы, а также изменения интенсивностей дифракционных рефлексов, обусловленных молекулярной структурой мышцы. В эксперименте регистрируется серия дифракционных картин (кадров) состояний структуры, соответствующих последовательным стадиям процесса мышечного сокращения. Время измерения разделяется на определенное число временных интервалов (длительности кадров), в каждом из которых производится одно измерение. На рисунке 5б приведена временная диаграмма эксперимента с примером управления шестью элементами: насосом для перекачки физиологического раствора из кюветы с мышцей (1); заслонкой рентгеновского пучка (2); датчиком силы (3); запуском ОД-3 (4); устройствами положительной (5) и отрицательной (6) электростимуляции мышцы. После старта одного цикла сокращения мышцы обеспечиваются следующие времена работы устройств: для насоса – T_1 ; для заслонки – T_3 ; для датчика силы – T_5 ; время счета ОД-3 в одном цикле – T_7 и в одном кадре – T_8 .

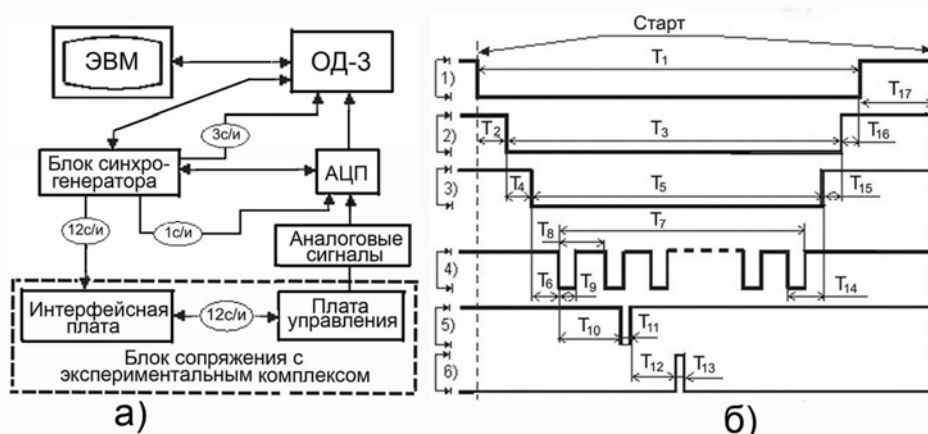


Рисунок 5. Система управления и регистрации параметров объектов: блок-схема (а) и временная диаграмма (б)

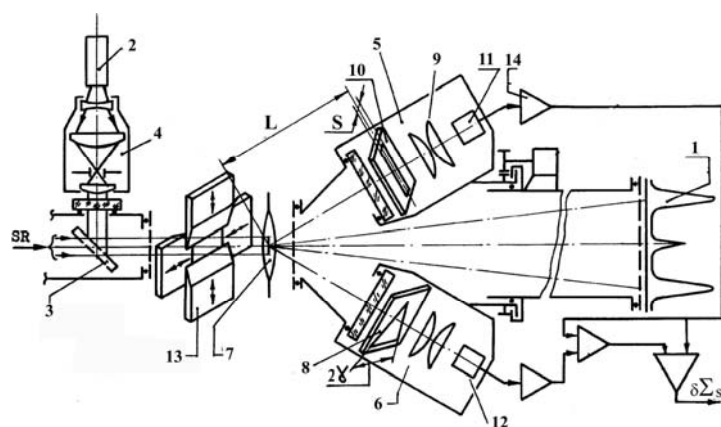


Рисунок 6. Схема лазерного дифрактометра

На рисунке 6 представлена схема лазерного дифрактометра, который введен в рентгендифракционную станцию для регистрации размеров молекулярных и субклеточных структур мышцы в процессе функционирования. Обеспечена одновременная регистрация дифракционных картин как в рентгеновском диапазоне 1_s , так и при контроле за изменением длины саркомера мышцы, который представляет повторяющиеся элементы структуры размером в несколько микрометров [4, 12, 18]. Используется гелий-неоновый лазер (2) ($\lambda = 632,8$ нм). Специальное зеркало (3) для совмещения рентгеновского и оптического пучков расположено в телецентрическом ходе лучей, сформированных оптической системой (4) от лазера (2).

Система регистрации оптической дифракции реализована по двухканальному варианту. Один канал является опорным (5) и основан на (+1)-ом дифракционном порядке спектра разложения. Во втором канале (6), основанном на (-1)-ом порядке, осуществлена пространственная модуляция дифрагированного потока от объекта (7) (например, при сокращении мышцы) с помощью диафрагм различной формы (8) (показана форма треугольника с углом 2γ). Опорный канал (5) имеет оптическую систему (9), в передней фокальной плоскости которой установлена щелевая диафрагма (10), что позволяет при изменении положения дифрагированного потока от объекта (7) иметь на выходе оптической системы постоянное сечение потока, регистрируемого фотоприемником (11).

На рисунке 7 приведены результаты исследования портяжной мышцы лягушки, полученные по методу «дифракционное кино». На рисунке 7а представлена дифрактограмма и временной ход интенсивности наиболее сильного меридионального рефлекса 14,3 нм сокращающейся мышцы при единичной (1) и парной (2) стимуляции. В активной мышце нами зарегистрировано короткоживущее (около 20 мс) состояние структуры, сформированной взаимодействием миофибриллярных и актиновых нитей. Выдвинута оригинальная гипотеза механизма генерации силы на основе принципа динамического сопряжения разноразмерных наноструктур с несоизмеримыми периодами. На рисунке 7б демонстрируются временная зависимость интенсивностей экваториальных рефлексов в процессе изометрического сокращения, инициированного парным стимулированием.

Иллюстрируется временной ход интенсивностей рефлексов от плоскостей (10) и (11) гексагональной решетки, сформированной толстыми и тонкими нитями саркомера мышцы. При нормальном состоянии мышцы (поз. 1) наблюдается совпадение максимума развиваемой силы с минимумом рефлекса (10), раньше которого (на ≈ 20 мс) наблюдается максимум рефлекса (11). По мере значительного утомления (поз. 2) наблюдается падение силы более чем в два раза и почти неизменяемые интенсивности рефлексов. Второй стимул, приложенный в фазе релаксации, не меняет поведения рефлекса (11). Однако при подборе оптимальной длительности межимпульсного интервала и подаче второго стимула в фазе нарастания напряжения наблюдается процесс реанимации мышцы (поз. 3) за счет резкого увеличения рефлекса (11), превышающего по абсолютной величине изменения рефлекса (10). Таким образом, второй стимул можно рассматривать как инструмент направленного изменения характера сокращения в разных фазах активного состояния мышцы [25].

На рисунке 8 приведены обобщенные результаты, полученные на канале накопителя Сибирь-2 методами SAXS/WAXS дифрактометрии от объектов: бегената серебра AgC_{22} ($\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{Ag}$) и коллагена сухожилия хвоста крысы. Показано, что при монохроматическом излучении с энергией ~ 8 КэВ осуществлена регистрация рефлексов в диапазоне углов 2θ от 800 мрад до 2,5 мрад.

В последние годы наблюдается развитие структурных методов на основе СИ для целей медицинской диагностики и терапии. Ткань волоса является перспективным биологическим материалом для решения прикладных задач в качестве диагностического материала для массового мониторинга экологического и санитарно-гигиенического риска. Неинвазивный способ выделения биоптатов, возможность неограниченно продолжительного хранения без консервации сделали волос уникальным материалом в экспериментальных исследованиях. В ряде медицинских центров широко используется элементный анализ волос с целью выявления

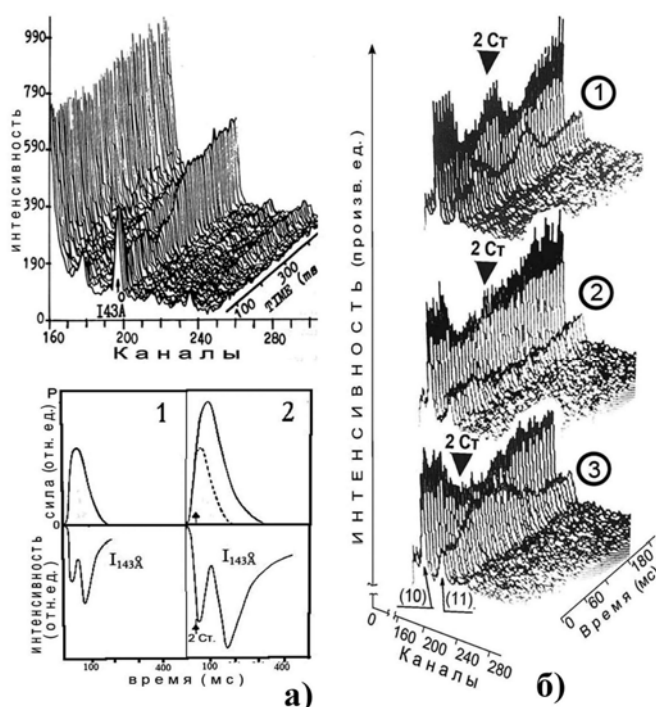


Рисунок 7. Дифрактограммы, полученные по методу высокого временного разрешения «дифракционное кино»

дисбаланса элементного содержания в организме человека, и даются рекомендации о его коррекции. Рентгендифракционный анализ волос настойчиво предлагался даже для диагностики патологии онкологического характера и оценки эффективности примененной терапии [26, 27].

Рентгенограммы волос дают характерную дифракционную картину. Имеется слабый след дуг поперек экватора, соответствующий молекулярному параметру 4,5 нм; периодичность этого рефлекса не меняется, но угловой размер этой дуги (текстура) и ширина дуги может увеличиваться так, что диффузная дуга будет трансформироваться в полное диффузное кольцо с высокими порядками. Рентгенограммы со слабой дугой были названы как рентгенограммы «без кольца», рентгенограммы с кольцами были названы как рентгенограммы «с кольцом».

На рисунке 9 представлена выборка из набора рентгенограмм длинного волоса (около 1 м) от индивидуального донора. Показан переход от рентгенограммы типа «без кольца» (а) к рентгенограмме типа «с кольцом» (б). Многие изменения на рентгенограммах ткани волоса обусловлены нарушениями защитной кислотно-жировой мантии. Многие детергенты могут разрушать защитную мантию кожи и волос, позволяя агрессивному внешнему окружению атаковать незащищенную ткань. Замена традиционных средств ухода за волосами на современные моющие средства может приводить к появлению на рентгенограммах кольца 4,5 нм. Таким образом, методики рентгендифракционного и флуоресцентного анализа волос могут быть рекомендованы в качестве критерия при выработке санитарных норм при сертификации новых медицинских и косметических средств ухода за волосами.

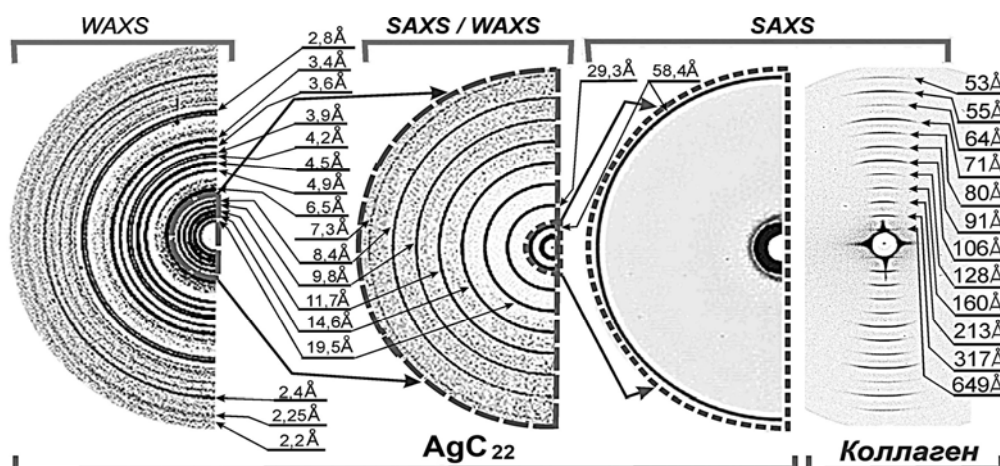


Рисунок 8. Обобщенные результаты по методикам SAXS/WAXS

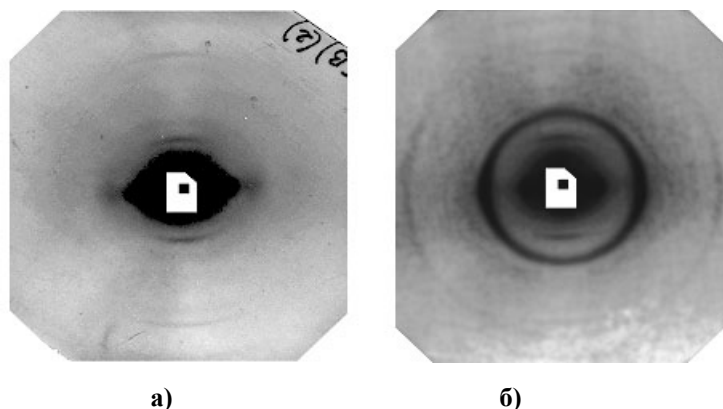


Рисунок 9. Выборка дифракционных картин от волоса индивидуального донора: а) начало косы и б) конец косы

Наша группа стремилась исследовать происхождение специфических изменений в рентгенограммах волос. Также имелись доноры, чьи волосы не давали рентгенограмму «с кольцом» от области корня волоса до кончиков. Мы изучали волосы от пациентов с раком молочной железы и от здоровых субъектов и сделали следующее заключение: возможность использования синхротронной дифракции волос для выявления патологических состояний типа рака молочной железы не подтвердилась [28, 29].

На рисунке 10а представлены совмещенные рентгенограммы – ткани волоса (вверху) и от опухолевой ткани молочной железы (внизу). На рисунке 10б представлена картина в диапазоне больших углов. Характерными рефлексами являются: кольцевой рефлекс $\sim 4,5$ нм, обусловленный периодичностью внеклеточных протеогликановых структур; меридиональный рефлекс $\sim 6,7$ нм и экваториальный рефлекс ~ 9 нм, обусловленные внутриклеточным белком кератином. Подобные дифракционные картины были получены от различных эпителиальных тканей человека и животных. Выявлено, что период повторяемости $4,65(\pm 0,15)$ нм является наноразмерным инвариантом структуры и слизи, и биологических тканей.

Была изучена структурная динамика волос в ходе растяжения (рис. 10в), которая проявляется как отчетливое смещение меридионального рефлекса $6,7$ нм в сторону малых углов вплоть до $8,0$ нм (при растяжении $\sim 50\%$). Показательно, что величина сдвига остается неизменной вдоль всей длины даже очень длинного волоса (до ~ 1 м), при этом положение экваториального рефлекса $4,5$ нм остается неизменным.

Методами SAXS/WAXS дифрактометрии с использованием СИ проведены структурные исследования широкого спектра образцов природного шелка, полученных из шелкопрядов *Antheraea mylitta* и *Bombix mori*, а также различных шелковых наноконструкций, включая тканево-инженерные скефолды. На рисунке 11 представлены рентгендифракционные картины различных природных и биоинженерных конструкций (скефолдов) природного шелка шелкопрядов *A. mylitta* (а) и *B. mori* (б). Выявлено различие степени текстурированности шелковых волокон при использовании различных методик получения нитей. В зависимости от степени натяжения нитей шелка в приготовленном образце в области больших углов дифракции были зарегистрированы картины с четкими дифракционными рефлексами, распределенными по слоевым линиям, или размытыми, дебаевского типа.

Рентгенограмма синтетических нитей представлена на рисунке 11в. На совмещенных рентгенограммах биоинженерных конструкций – скефолдов (рис. 11г) из шелкопряда *A. mylitta* (внизу) зарегистрирована серия острых интенсивных дебаевских колец с периодами $4,1$, $2,05$ и $1,37$ нм, которые локализованы в позиционном отношении $3:2:1$, что характерно для линейной периодичности цепных молекул. Рентгенограмма аналогичных скефолдов из *B. mori* (вверху) демонстрирует гораздо больше дебаевских колец, которые можно сгруппировать

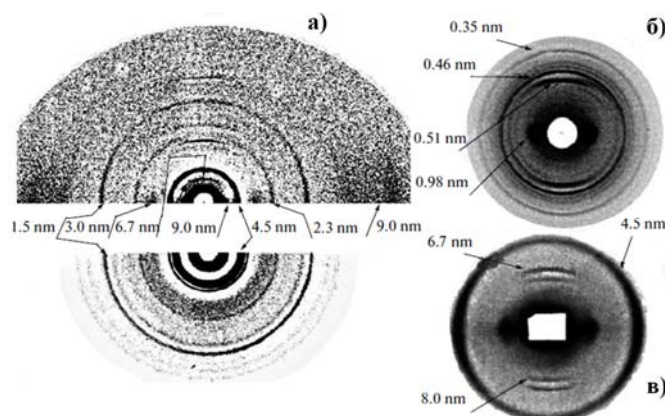


Рисунок 10. Двумерные рентгенограммы ткани волоса и опухолевой ткани молочной железы

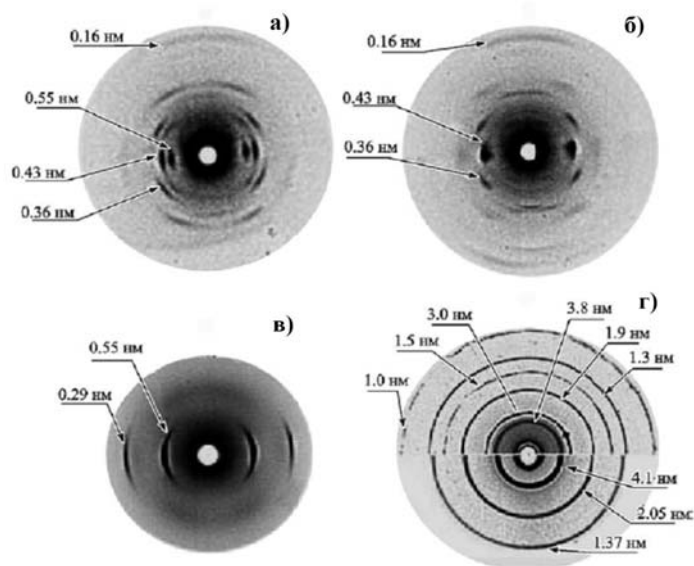


Рисунок 11. Двумерные рентгенограммы различных природных и биоинженерных конструкций природного шелка

в две серии с линейной периодичностью: 3,8, 1,9, 1,3 нм и 3,0, 1,5, 1,0 нм, и атрибутировать к двум компонентам цепных молекул, формирующих 3D конструкцию скефолда.

Изучение наноструктурной динамики фибриллярных структур шелка в широком диапазоне температур может дать неожиданные и крайне существенные результаты для решения прикладных задач для целей медицинской диагностики и разработки ряда технологических процессов. Композиты на основе природного шелка в силу его высокой прочности, биосовместимости и биodeградируемости, могут быть уникальным материалом, пригодным для биотехнологических и медицинских целей [30].

Исследовался структурный механизм модификационной адаптации под синергическим воздействием различных параметров высокочастотной электрохирургической сварки (ВЧ-сварки): изменение температуры, геометрия инструментария, давление, модуляция электромагнитного поля [31, 32]. Модификационная адаптация, обусловленная изменением физико-химических параметров среды, – это обратимое изменение термодинамических свойств функциональных систем биологических организмов при неизменном генотипе. В работе проведены молекулярные и наноструктурные исследования двух биологических систем, активно контактирующих с внешней средой: (1) эпителиальные ткани желудочно-кишечного тракта, который является открытой динамической системой, обеспечивающей поступление в организм энергии и вещества из пищевой цепочки в результате синергического взаимодействия наноструктурной упорядоченности протеогликановых систем с внешней средой; (2) природные конструкции кокона шелка, локализованные вне клетки или даже вне организма. Структуре кокона присуща динамическая реактивность, благодаря которой экономно организованные системы оперативно реагируют на сигнальные воздействия, удерживая живую систему в диапазоне физиологически допустимых границ на весь период метаморфозы независимо от генного контроля организма шелкопряда.

На рисунке 12 представлены совмещенные двумерные рентгенограммы ткани кишки (а) и кокона шелка (б) в норме (левая часть) и после воздействия на них ВЧ-сваркой (правая часть). Рентгенограммы различных интактных образцов ткани кишки мало информативны, они характеризуются интенсивным малоугловым диффузным рассеянием, индикатриса которого имеет радиальную симметрию. Дифракционные линии на рентгенограмме тонкой кишки практически не выявляются (рис. 12а, левая часть), что, возможно, обусловлено незначительной концентрацией рассеивающих компонентов и значительным поглощением большей толщиной образца.

После ВЧ-воздействия (рис. 12а, правая часть) зарегистрировано существенное изменение дифракционной картины: рентгенограмма сварного шва в области малых углов буквально «набита» острыми дифракционными кольцами, зарегистрированы четкие одиночные дебаевские рефлексы (3,7, 1,35 нм); можно выделить и серию рефлексов: 4,65, 2,32, 1,55 нм, которые расположены с позиционными отношениями 3:2:1, что характерно для линейной периодичности с основным периодом 4,65 нм. Серия острых дебаевских колец с основным периодом 4,65 нм атрибутирована нами ранее как период идентичности, обусловленный регулярным прикреплением в процессе пост-трансляционной модификации олигосахаридных цепей к белковому кору гигантской молекулы протеогликанов слизи и межклеточного матрикса тканей. Протеогликаны являются компонентами основного вещества межклеточного матрикса эпителиальных тканей и продуцируемых ими слизей.

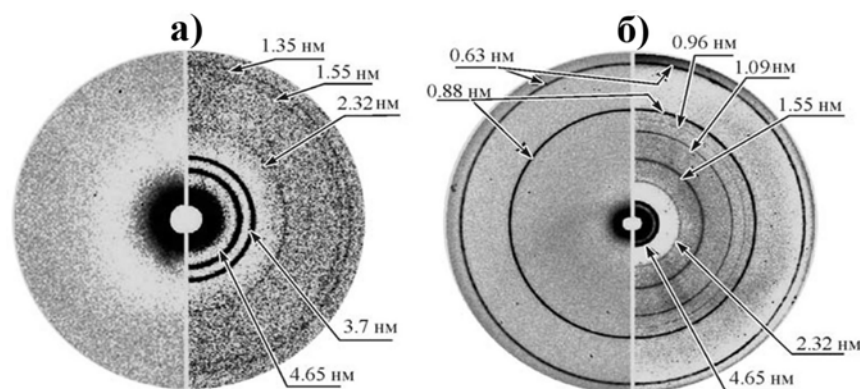


Рисунок 12. Совмещенные двухмерные рентгенограммы ткани кишки (а) и кокона шелка (б) в норме (слева) и после ВЧ электрохирургического воздействия (справа)

Феномен появления новых дифракционных линий после ВЧ-электрохирургического воздействия был выявлен нами также на образцах кокона шелка шелкопряда *Bombyx mori* (рис. 12б): зарегистрированы многочисленные тонкие дебаевские кольца, обусловленные наноструктурной упорядоченностью, молекулярная структура при этом оставалась стабильной. Под действием ВЧ-сварки на рентгенограмме стенки кокона регистрируется серия дебаевских колец (4,65, 2,32 и 1,55 нм), которые могут быть атрибутированы к наноструктурной упорядоченности, характерной для сетки протеогликановых фибрилл, сформированной при взаимодействии катионов кальция с анионными группами олигосахаридов протеогликана. Наличие протеогликанового компонента в структуре кокона вполне допустимо, поскольку компоненты шелка – фиброин и серицин – продуцируются шелковой glandой, дифракционная картина которой [32, 33] демонстрирует наличие серии дифракционных колец с основным периодом 4,8 нм, характерной для протеогликановых систем эпителиальных тканей. Добавление третьего фибриллярного протеогликанового компонента к известным белковым компонентам шелка позволяет предложить исполнительный механизм адаптации природной конструкции кокона шелка к широкому спектру внешних воздействий.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что протеогликановые системы являются универсальным компонентом биологических тканей, слизи и других биологических конструкций, обеспечивающим широкий спектр адаптационных свойств. По-видимому, механизмы модификационной адаптации к изменению многочисленных факторов внешней среды в широком диапазоне параметров лежат в основе длительной структурной и функциональной устойчивости гетерогенных комплексов, а при синергическом воздействии контролируемых параметров ВЧ-сварки на поврежденную ткань – в основе ее репарации.

Количественно измеряемые параметры рентгеновских дифракционных данных могут быть использованы в качестве маркера физиологического статуса биологической ткани при вариации синергических воздействий среды на организм.

Список литературы / References:

1. Kulipanov G.N. The status of SR Research in the Soviet Union. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1987, vol. A261, pp. 1-7.
2. Belyaev S.T., Stankevitch V.G. Kurchatov Synchrotron Radiation Source status report. *Review of Scientific Instruments*, 1995, vol. 66, no. 2, pp. 2358-2361.
3. Vazina A.A. Biological application of synchrotron radiation: from Artem Alikhanyan to nowadays. *Brilliant Light in Life and Material Sciences. NATO Security through Science – B: Physics and Biophysics*, 2007, pp. 121-131.
4. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 883725, заявка № 2890450, 1980. [Korneev V.N., Gerasimov V.S., Author's certif. no. 883725, request no. 2890450, 1980 (in Russ.)]
5. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 883726, заявка № 2890452, 1980. [Korneev V.N., Gerasimov V.S., Author's certif. no. 883726, request no. 2890452, 1980 (in Russ.)]
6. Корнеев В.Н. Автор. свид. № 915098, заявка № 2974857, 1980. [Korneev V.N. Author's certif. no. 915098, request no. 2974857, 1980 (in Russ.)]
7. Корнеев В.Н. Автор. свид. № 1073803, заявка № 3509672, 1982. [Korneev V.N. Author's certif. no. 1073803, request no. 3509672 (1982) (in Russ.)]
8. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1167484, заявка № 3659145, 1983. [Korneev V.N. et al. Author's certif. no 1167484 (USSR), Bull. Isobr., 1985, no. 26 (in Russ.)]
9. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1289269, заявка № 3849209, 1985. [Korneev V.N. et al. Author's certif. no. 1289269, request no. 3849209, 1985 (in Russ.)]
10. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 1327717, заявка № 3947700, 1985. [Korneev V.N., Gerasimov V.S. Author's certif. no. 1289269, request no. 3947700, 1985 (in Russ.)]
11. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 1245969, заявка № 3849208, 1985. [Korneev V.N., Gerasimov V.S. Author's certif. no. 1289269, request no. 3849208, 1985 (in Russ.)]

12. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1245970, заявка № 3850412, 1985. [Korneev V.N. et al Author's certif. no. 1245970, request no. 3850412, 1985 (in Russ.)]
13. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 1322889, заявка № 3947566, 1985. [Korneev V.N., Gerasimov V.S. Author's certif. no. 1322889, request no. 3947566, 1985 (in Russ.)]
14. Корнеев В.Н., Матюшин А.М. Автор. свид. № 1322799, заявка № 3947565, 1985. [Korneev V.N., Matyushin A.M. Author's certif. no. 1322799, request no. 3947565, 1985 (in Russ.)]
15. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1521134, заявка № 4385519, 1988. [Korneev V.N. et al. Author's certif. no. 1521134, request no. 4385519, 1988 (in Russ.)]
16. Герасимов В.С. и др. Малоугловая рентгеновская камера с использованием синхротронного излучения. *Приборы и техника эксперимента*, 1976, т. 3, с. 217. [Gerasimov V.S. et al. Pribory i Tekhnika Eksperimenta, 1976, vol. 3, p. 217. (in Russ.)]
17. Корнеев В.Н. и др. Камера ФРАКС для малоугловой монохроматической дифрактометрии на синхротронном рентгеновском излучении. *Приборы и техника эксперимента*, 1984, т. 5, с. 180. [Korneev V.N. et al. Camera FRAKS for monochromatic small-angle diffraction of synchrotron x-rays. Pribory i Tekhnika Eksperimenta, 1984, vol. 5, p. 180. (in Russ.)]
18. Gadzhiev A.M. et al. Combination of optical and small-angle X-ray scattering diffractometers in the high-time-resolution method for structural studies. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1989, vol. A289, p. 728.
19. Gerasimov V.S. et al. Search for biological objects by refraction radiography using synchrotron radiation of the VEPP-3 storage ring. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1998, vol. A405, no. 2-3, p. 525.
20. Aul'chenko V.M. et al. Status of method of time-resolved X-ray diffraction studies of biological objects at the Siberian SR Centre. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2000, vol. A448, p. 245.
21. Korneev V.N. et al. The role of instrumental-methodical developments with the use of synchrotron radiation for researching the transformation of nanostructural parametres in biological objects. *Advances in biosensors and bioelectronics (ABB)*, 2013, vol. 2, no. 4, p. 65.
22. Aul'chenko V.M. et al. A small-angle X-ray diffractometry station using a synchrotron radiation sources: design and adjustment modes. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1995, vol. A359, p. 216.
23. Aul'chenko V.M. et al. The station for time-resolved investigation in wide and small angles of diffraction. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1998, vol. A405, no. 2-3, p. 487.
24. Korneev V.N. et al. X-ray stations based on cylindrical zoom lenses for nanostructural investigations using synchrotron radiation. *J. of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2012, vol. 6, no. 5, p. 849.
25. Aul'chenko V.M. et al. Current status of the studies of biological objects by the time resolved X-ray diffraction technique. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2005, vol. A543, p. 143.
26. James V., Kearsley J., Irving T., Amemiya Y., Cookson D. Using hair to screen for breast cancer. *Nature*, 1999, vol. 398, p. 33.
27. Corino G.L. and French P.W. Diagnosis of breast cancer by X-ray diffraction of hair. *Int. J. Cancer*, 2008, vol. 122, p. 847.
28. Aksirov A.M. et al. Biological and medical application of SR from storage rings VEPP-3 and "Siberia-2". The origin of specific changes of small-angle X-ray diffraction pattern of hair and their correlation with the elemental contain. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2001, vol. A470, p. 380.
29. Vazina A.A. et al. X-ray diffraction study of the nanostructural dynamics of fibrillar systems of hair tissue. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2015, vol. 79, no. 1, p. 75.
30. Vazina A. A. et al. Study of molecular and nanostructural dynamics of biological tissues under the influence of high-frequency electrosurgical welding. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2013, vol. 77, no. 2, p. 146.
31. Vazina A.A. et al. Synergistic influence of HF-welding on nanostructural orderliness of epithelial tissues of gastrointestinal tract. "Synchrotron and Free electron laser Radiation: generation and application (SFR-2016)". *Book of abstracts*. Novosibirsk, Russia, 2016, p.41.
32. Vazina A.A. et al. Nanostructural mechanism of modifying adaptation of proteoglycan systems of biological tissues and mucus. *Crystallography Reports*, 2018, vol. 63, no. 7, pp. 1063-1070.
33. Vazina A.A. et al. X-ray diffraction study of structural stability of giant proteoglycan molecules of mucus. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2009, vol. A603, p. 90.

INSTRUMENTAL AND METHODOLOGICAL DEVELOPMENTS FOR THE STUDY OF BIOLOGICAL STRUCTURES USING SYNCHROTRON RADIATION

Korneev V.N.¹, Shlektarev V.A.², Zabelin A.V.³, Lanina N.F.², Tolochko B.P.⁴, Vazina A.A.²¹ Institute of cell biophysics, FRC PSCBR of RAS*Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: kvn_40@mail.ru*² Institute of theoretical and experimental biophysics of RAS, Pushchino³ National research center "Kurchatov Institute"*Moscow, Russia*⁴ Budker Institute of nuclear physics, SB of RAS*Novosibirsk, Russia*

Abstract. The major elements involved in instrumental and methodical developments for biological tissue studying by means the structural biology methods based on using synchrotron radiation (SR) from VEPP-3 and Siberia-2 storage rings from two Russian centres of collective using - in the Siberian and Moscow regions are considered. Our basic concern is to study mechanisms of structural and functional stability of native and transformed human and animal tissues under various physicochemical influences. Possibilities of produced equipment and methods, as well as the experimental data on biological polymers having different degrees of order at the molecular or nanoscale level are presented.

Key words: *synchrotron radiation, system of primary collimators, high time-resolved X-ray diffraction.*

ИЗМЕРЕНИЕ ВНУТРЕННЕЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПАССИВНОЙ АКУСТИЧЕСКОЙ ТЕРМОМЕТРИИ

Ерофеев А.В.¹, Аносов А.А.^{1,2}, Мансфельд А.Д.³, Шаракшанэ А.А.², Щербаков М.И.²

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
ул. Трубецкая, 8, стр. 2, Москва, 119991, РФ; e-mail: anosov.aa@1msmu.ru, erofeev.av@1msmu.ru

² Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН

ул. Моховая, 11/7, Москва, 125009, РФ

³ Институт прикладной физики РАН

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

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. Методом пассивной акустической термометрии измеряли глубинную (акустояркую) температуру в предплечье испытуемых при нанесении разогревающих мазей на кожу. В первые 5-10 мин зарегистрировано уменьшение акустояркой температуры на 3-6 К. После этого значения акустояркой температуры возвращались на уровень, который был до нанесения мази. Далее значения акустояркой температуры при применении одних мазей повышалась, а при других оставалась прежней и даже понижалась. Уменьшение глубинной температуры мы связываем с тем, что при измерениях использовался гель комнатной температуры. С одной стороны, нанесение на кожу «холодного» геля должно снижать поверхностный кровоток. Однако, использование разогревающих мазей временно блокировало этот процесс. В результате во внутренние ткани предплечья поступала «холодная» кровь из приповерхностных капилляров, что приводило к охлаждению тканей. Эффект был учтен в рамках уравнения теплопроводности с кровотоком путем изменения используемого в уравнении параметра, а именно температуры притекающей крови. Рассчитанная с использованием уравнения теплопроводности временная зависимость акустояркой температуры согласуется с экспериментальными данными.

Ключевые слова: тепловое акустическое излучение, уравнение теплопроводности с кровотоком, акустояркая температура.

ВВЕДЕНИЕ

В ряде медицинских задач важны неинвазивные безболезненные измерения глубинной температуры участков тела человека. В настоящее время для этого разрабатываются различные методы [1-3], имеющие свои преимущества и недостатки. Например, для измерения глубинной температуры участков тела человека можно использовать пассивную акустическую термометрию [4-7], которая позволяет восстановить температурное распределение с миллиметровым разрешением на глубине вплоть до 5-8 см [8-10]. При разработке алгоритмов восстановления можно восстанавливать не саму температуру, а теплофизические параметры [11-14], например, параметры уравнения теплопроводности с учетом кровотока (уравнения Пеннесса [15, 16]), которому подчиняется температурное распределение $T(t, x)$. В одномерном случае уравнение Пеннесса выглядит следующим образом:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = a^2 \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} - \eta(T - T_0), \quad (1)$$

где t – время; x – ось, направленная вглубь предплечья; T_0 – температура притекающей крови, которую принято брать равной 37°C – температуре теплового ядра организма; η – удельный кровоток; a^2 – коэффициент температуропроводности. Представляется интересным посмотреть условия, при которых уравнение (1) модифицируется. Например, выделяют температурно-зависимую и не зависящую от температуры составляющие кровотока [17].

Отметим, что задача контроля температуры при гипертермии актуальна и при классических исследованиях в медицинской биофизике. Например, в работе [18] проанализировано изменение индекса деформируемости эритроцитов у крыс после 30-минутной гипертермии.

В настоящей работе мы исследовали уравнение (1) методом пассивной акустической термометрии. Мы увеличивали поверхностный кровоток в предплечье путем нанесения разогревающих мазей на кожу. При этом нанесение на кожу геля для ультразвуковых исследований, что необходимо при акустической термометрии, должно было снижать поверхностный кровоток. В результате в течение некоторого времени после нанесения мази измеренная глубинная температура значительно снижалась. В рамках модели, описываемой уравнением (1), это могло быть связано с изменением параметра T_0 – температуры притекающей крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для измерений теплового акустического излучения был использован многоканальный акустотермограф [19, 20], разработанный в ИПФ РАН (полоса пропускания 1,6-2,5 МГц, пороговая чувствительность при времени интегрирования 10 с – 0,2 К). Принимаемые акустические сигналы преобразовывались в электрические, которые усиливались, проходили через квадратичный детектор и усреднялись в течение 30 мс. С выходов многоканального акустотермографа сигналы подавались на 14-ти разрядный многоканальный АЦП Е14-140 (ЗАО «L-Card», Москва, Россия) с частотой дискретизации 1 кГц на один канал. Разработанная программа проводила дальнейшее усреднение данных.

Для измерения поверхностной температуры руки использовался портативный компьютерный термограф ИРТИС-2000 (ООО "Иртис", Москва, Россия) с чувствительностью к перепаду температур (на уровне 30°C) 0,05 К, регистрировавший тепловое электромагнитное излучение в инфракрасном (ИК) диапазоне 3-5 мкм.

Для изменения кровотока на предплечье испытуемого (см. рис. 1) наносили различные мази: Капсикам, Финалгон, скипидарную мазь. Представленное в инструкции по применению фармакологическое действие Капсикама и Финалгона сходно: мази обладают сосудорасширяющим действием, о Капсикаме говорится как о разогревающей мази, действие Финалгона сопровождается ощущением тепла. После нанесения Капсикама температура кожи повышается на 1-2°C в течение 2-3 ч. Скипидарная мазь разогревающего действия не оказывает, при этом скипидар живичный (или терпентиновое масло) входит в состав Капсикама.

Эксперимент проводили следующим образом. С помощью термографа измеряли поверхностные температуры предплечий. Затем на левое предплечье наносили в первый раз гель для УЗИ «Медиагель». Продолжали измерять поверхностные температуры предплечий и начали измерять акустояркость акустотермометрической температуры левого предплечья. Эти измерения проводили для контроля. Акустотермометрический датчик находился при комнатной температуре в кювете, которая являлась акустическим черным телом. При измерении датчик вынимали из кюветы, после чего помещали его обратно. Стёрли гель с левого предплечья и на оба предплечья нанесли мазь. Из тюбиков выдавливали объем 60 ± 15 мкл. Размер пятна составлял 50 ± 5 мм. Во второй раз на левое предплечье нанесли гель и продолжили измерять акустояркость акустотермометрической температуры. Параллельно продолжали измерять поверхностные температуры предплечий. Измерения проводили на двух испытуемых возрастом 56 лет и 53 года, которые дали письменное информированное согласие на исследование.

Модель.

Предполагается, что нанесение разогревающих мазей на кожу увеличивает кровоток в предплечье. Согласно уравнению (1) это приводит к увеличению глубинной температуры. Если разогревающая мазь не используется, то нанесение геля комнатной температуры на кожу должно снижать поверхностный кровоток, что позволяет организму уменьшить теплоотдачу в окружающую среду. Нанесение на кожу и разогревающей мази, и геля приводит в действие конкурирующие процессы – увеличения и уменьшения кровотока. В предлагаемой модели этот процесс определяется изменением температуры притекающей крови T_0 – параметра уравнения (1).

Для определения глубинной температуры $T(t, x)$ численно решали уравнение (1). Момент нанесения мази задавали как $t = 0$. Момент начала измерений (момент первого нанесения геля на кожу) определяли как $t_0 < 0$. При этом в течение первых нескольких минут t^* после нанесения разогревающих мазей температуру притекающей крови изменяли:

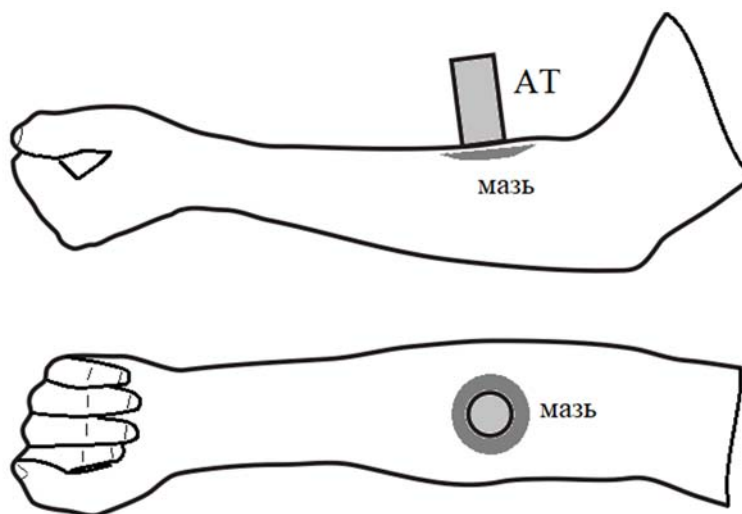


Рисунок 1. Схема измерения акустотермометрической температуры предплечья; АТ – датчик акустотермометра

$$T_0 = \begin{cases} 37^\circ\text{C}, & \text{если } t_0 \leq t < 0 \text{ или } t \geq t^* \\ T_0^*, & \text{если } 0 \leq t < t^* \end{cases}.$$

Также для временного промежутка, следующего за нанесением мази, увеличивали кровоток в k раз.

$$\eta = \begin{cases} \eta_0, & \text{если } t < 0 \\ k\eta_0, & \text{если } t \geq 0 \end{cases}.$$

В качестве начального условия мы взяли стационарное решение уравнения теплопроводности (1):

$$T(x, t_0) = T_0 + \frac{(T_{surf\ 0} - T_0) \left[\sinh\left(\sqrt{\eta_0/a^2}(d-x)\right) + \sinh\left(\sqrt{\eta_0/a^2}x\right) \right]}{\sinh\left(\sqrt{\eta_0/a^2}d\right)}, \quad (2)$$

где $T_{surf\ 0}$ – измеренная ИК термографом поверхностная температура предплечья до нанесения геля, температуру притекающей крови брали равной $T_0 = 37^\circ\text{C}$; $d = 8$ см – толщина предплечья.

Граничные условия определялись по результатам измерений поверхностных температур ладонной ($x = 0$) и тыльной ($x = d$) поверхностей предплечья $T(0, t) = T_{surf\ palm}$ и $T(d, t) = T_{surf\ back}$.

В эксперименте основной измеряемой величиной являлась акустояркая температура. Это интегральная характеристика, равная температуре акустического черного тела, создающего такую же плотность потока теплового акустического излучения, как и исследуемый объект. Акустояркая температура в условиях эксперимента определяется выражением [21]:

$$T_A(t) = \int_0^d \gamma T(t, x) \exp(-\gamma x) dx, \quad (3)$$

где γ – коэффициент поглощения ультразвука (по интенсивности). В данной модели предполагается, что исследуемая среда акустически однородна, и коэффициент поглощения не зависит от температуры. Решение уравнения (3) получали численно. Отметим, что акустояркая температура определяется, согласно интегралу (3), глубиной температурой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 для примера представлены временные зависимости акустояркой температуры, полученные до нанесения на кожу мази Капсикам (1), приблизительно через минуту после ее нанесения (2) и через час после нанесения (3). Низкий уровень сигнала соответствует акустояркой температуре кюветы (комнатной температуре) $20,8 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Высокий уровень показывает акустояркую температуру ладонной стороны левого предплечья. До нанесения мази акустояркая температура предплечья с гелем составляла $33,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$, через минуту после нанесения – $27,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$, через час после нанесения – $34,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

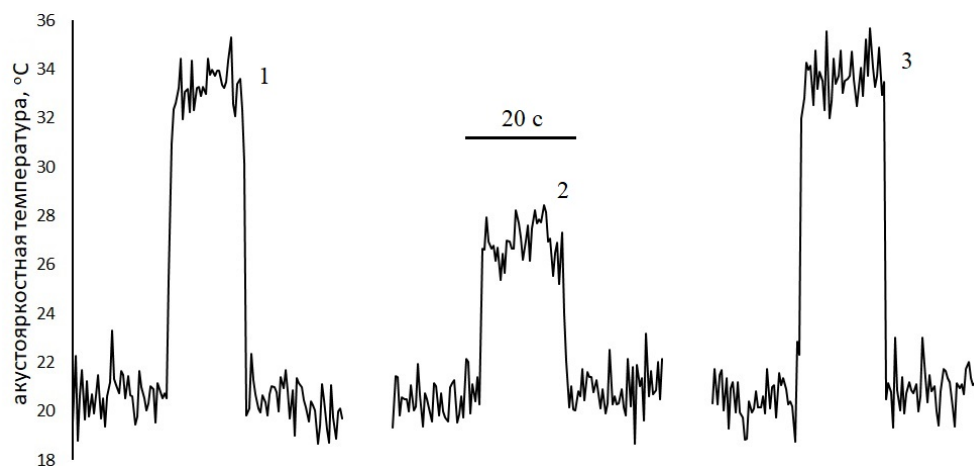


Рисунок 2. Запись акустояркой температуры кюветы с датчиком (низкий уровень сигнала) и предплечья (высокий уровень) до нанесения Капсикама (1), через минуту после (2) и через час после нанесения (3); частота измерений – 2 Гц

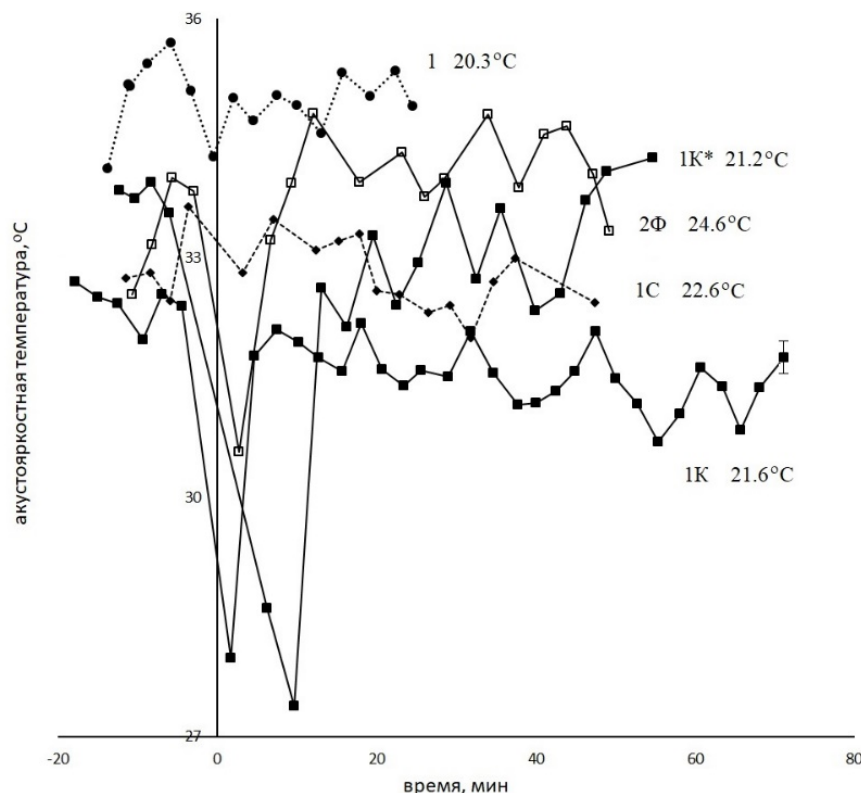


Рисунок 3. Изменения во времени акустоярковой температуры левого предплечья испытуемого 1 при нанесении на кожу Капсикама (1К), (1К*), при нанесении на кожу скипидарной мази (1С), без мази (1); испытуемого 2 при нанесении на кожу Финалгона (2Ф); указаны комнатные температуры; в нулевой момент времени на кожу нанесли мазь; погрешность измерений для всех экспериментальных точек одинакова, показана для одной точки

Результаты измерения акустоярковой температуры показаны на рисунке 3. После нанесения мазей Капсикам и Финалгон (но не скипидарной мази!) в течение 5-10-и мин акустоярковая температура снизилась на статистически значимую величину: у испытуемого 1 после Капсикама на $5,6 \pm 0,8^\circ\text{C}$ и у испытуемого 2 после Финалгона на $2,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$. Через приблизительно 10 мин значения акустоярковой температуры возвращались на уровень, который был до нанесения мази. После нанесения скипидарной мази или в отсутствии мази значимого снижения акустоярковой температуры у испытуемого 1 не было обнаружено.

Результаты измерения поверхностной температуры показаны на рисунок 4. Через 40-50 мин поверхностная температура правого предплечья при нанесении и Капсикама, и Финалгона (но не скипидарной мази) у обоих испытуемых повысилась в среднем на $1,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$, что, на наш взгляд, соответствует указанному в инструкции по применению Капсикама: «температура кожи повышается на $1-2^\circ\text{C}$ в течение 2-3 ч». После нанесения всех мазей (и Капсикама, и Финалгона, и скипидарной) в течение 5-10-и мин поверхностная температура снизилась на статистически значимую величину: у испытуемого 1 после Капсикама и скипидарной мази на $1,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$, у испытуемого 2 после Финалгона на $1,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$. Это снижение поверхностной температуры отличается от снижения акустоярковой температуры тем, что, во-первых, поверхностная температура снизилась на меньшую величину, а во-вторых тем, что поверхностная температура снизилась и после нанесения скипидарной мази, в то время как в этом случае акустоярковая температура не менялась.

Снижение поверхностной температуры при нанесении на кожу мази является ожидаемым результатом. Причиной этого является изменение режима испарения с поверхности кожи. Значительного влияния на глубинную температуру это не оказывает, что подтверждается отсутствием значимого изменения акустоярковой (глубинной) температуры после нанесения на кожу скипидарной мази.

Важным является вывод о том, что при нанесении геля комнатной температуры на кожу действие «разогревающих мазей» (Капсикама и Финалгона) в течение первых 5-10 мин приводит к уменьшению глубинной температуры на несколько градусов. По истечению этого времени указанный эффект прекращается.

Нам представляется, что уменьшение глубинной температуры сразу после нанесения разогревающих мазей комнатной температуры связано с их двояким действием: сначала мазь действует физически как тело более низкой температуры и снижает температуру приповерхностных тканей, вызывая компенсаторное увеличение поверхностного кровотока, а потом уже включаются химические свойства мази, разогревающие поверхностные ткани, что при повышении кровотока приводит к усилению притока крови из теплового ядра организма и к

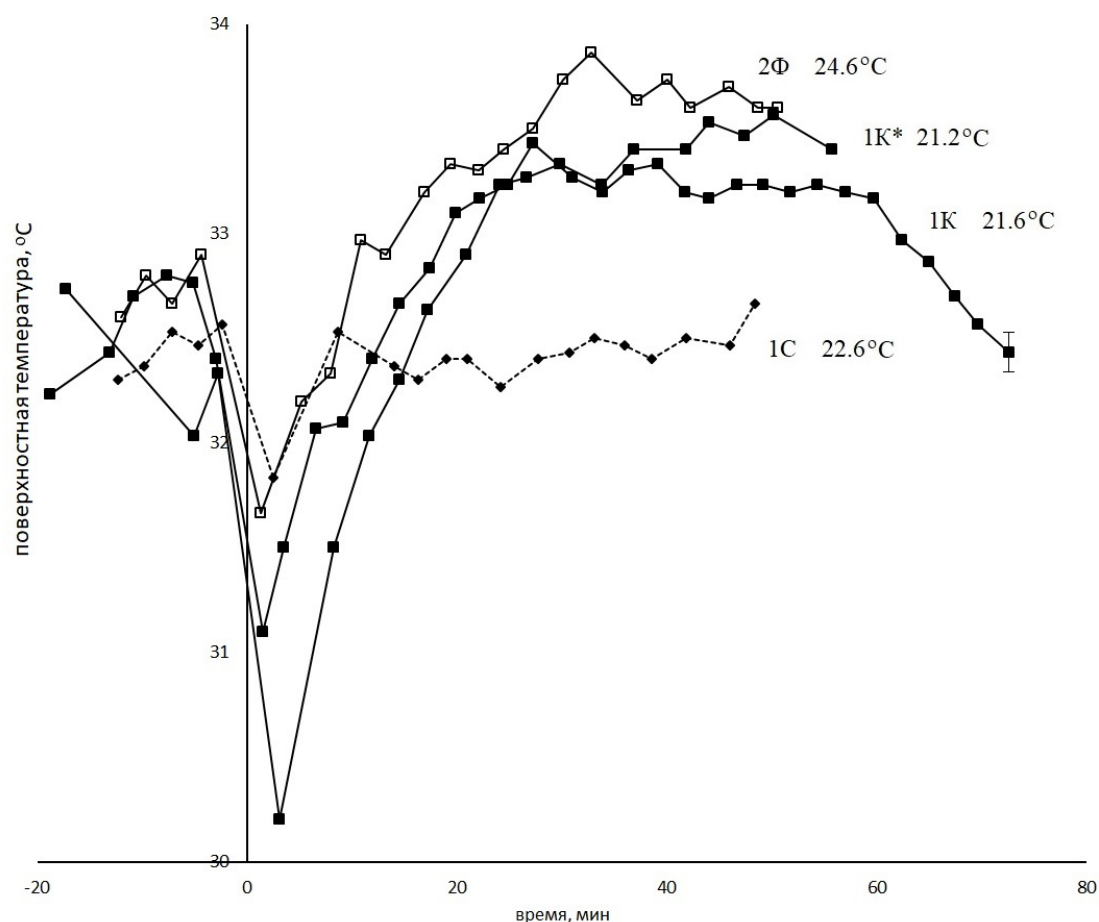


Рисунок 4. Изменения во времени поверхностной температуры правого предплечья испытуемого 1 при нанесении на кожу Капсикама (1К), (1К*), при нанесении на кожу скипидарной мази (1С); испытуемого 2 при нанесении на кожу Финалгона (2Ф); указаны комнатные температуры; в нулевой момент времени на кожу нанесли мазь.; погрешность измерений для всех экспериментальных точек одинакова, показана для одной точки

нагреванию внутренних тканей. Таким образом, когда кожа контактирует с гелем комнатной температуры, то кровь в приповерхностных капиллярах охлаждается, а увеличение поверхностного кровотока приводит к тому, что эта охлажденная кровь поступает во внутренние ткани, что приводит к снижению глубинной температуры. Мы полагаем, что, если из этой цепочки событий убрать начальную низкую температуру разогревающих мазей, то поверхностный кровоток не снизится, и внутренние ткани не будут охлаждаться. Таким образом, при использовании разогревающих мазей целесообразно предварительно их нагревать до температуры тела, чтобы избежать снижения поверхностного кровотока и траты энергии организма на дополнительный нагрев и усиление кровотока из теплового ядра тела человека.

В рамках уравнения (1) описанный процесс можно моделировать, изменяя температуру притекающей крови T_0 . На рисунке 5 показан результат расчета акустяркостной температуры как функции времени (кривая 1). Параметры уравнения (1) были выбраны, исходя из литературных данных: коэффициент температуропроводности $a^2 = 0,12 \text{ мм}^2/\text{с}$ [21], кровоток $\eta_0 = 1,05 \text{ л/с}$ – близок кровотоку скелетных мышц [22]. Измеренная начальная температура на поверхности предплечья составляла $T_{surf0} = 32^\circ\text{C}$. Граничные температуры также измерялись в ходе эксперимента: для ладонной поверхности была взята средняя температура $T_{surf\ palm} = 26^\circ\text{C}$. Температура тыльной поверхности предплечья практически не менялась в ходе эксперимента $T_{surf\ back} = T_{surf0}$. Значения коэффициента $k = 1,3$ и времени $t^* = 5 \text{ мин}$ подбирались, чтобы наилучшим образом согласовать расчетную кривую и экспериментальные данные, которые были получены путем усреднения результатов трех экспериментов (см. рис. 3, 1К, 1К*, 2Ф). Температура притекающей крови во временном интервале $[0, t^*]$ равнялась температуре ладонной поверхности предплечья $T_0^* = T_{surf\ palm}$. Коэффициент поглощения $\gamma = 0,025 \text{ л/мм}$ был выбран исходя из литературных данных [22]. Как видно из рисунка 5, расчетная временная зависимость акустяркостной температуры в целом согласуется с экспериментальными данными.

Основные ограничения рассмотренной модели связаны с использованием одномерного по пространству уравнения и с однородностью анализируемых параметров. Мы получили экспериментальный результат – уменьшение глубинной температуры при использовании разогревающих мазей определенной температуры,

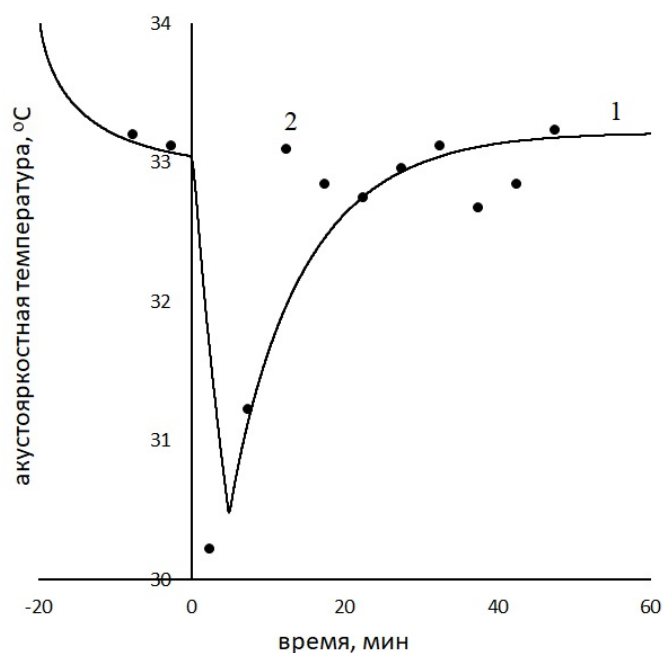


Рисунок 5. Рассчитанная (1) и экспериментальная усредненная (2) акустяркостные температуры как функции времени; в нулевой момент времени на кожу нанесли мазь; усреднены данные кривых 1К, 1К*, 2Ф на рисунке 3

связали его с увеличением поверхностного кровотока, указали на то, что при таких условиях меняется температура притекающей крови и использовали уравнение Пеннесса с модифицированным параметром для согласования расчета с экспериментом.

Работа поддержана «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров» (5-100) и РФФИ, грант № 18-29-02052 мк, выполнена в рамках государственного задания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН, а также частично в рамках Госзадания Института прикладной физики РАН № 0035-2014-0008.

Список литературы / References:

1. Winter L., Oberacker E., Paul K., Ji Y., Oezderm C., Ghadjar P., Thieme A., Budach V., Wust P., Niendorf T. Magnetic resonance thermometry: Methodology, pitfalls and practical solutions. *Int. J. Hyperthermia*, 2016, vol. 32, no. 1, pp. 63-75.
2. Pouch A.M., Cary T.W., Schultz S.M., Sehgal C.M., In Vivo Noninvasive Temperature Measurement by B-Mode Ultrasound Imaging. *J. Ultrasound Med.*, 2010, vol. 29, pp. 1595-1606.
3. Hand J.W., Van Leeuwen G.M.J., Mizushima S., Van de Kamer J.B., Maruyama K., Sugiura T., Azzopardi D.V., Edwards A. D., Monitoring of deep brain temperature in infants using multi-frequency microwave radiometry and thermal modelling. *Phys. Med. Biol.*, 2001, vol. 46, pp. 1885-1903.
4. Буров В.А., Дариалашвили П.И., Евтухов С.Н., Румянцева О.Д. Экспериментальное моделирование процессов активно-пассивной термоакустической томографии. *Акуст. журн.*, 2004, т. 50, № 3, с. 298-310. [Burov V.A., Darialashvili P.I., Evtukhov S.N., Rummyantseva O.D. Experimental modeling of the processes of active-passive thermoacoustic tomography. *Acoustical Physics*, 2004, vol. 50, no. 3, pp. 243-254. DOI: 10.1134/1.1739492. (In Russ.)]
5. Миргородский В.И., Герасимов В.В., Пешин С.В. Экспериментальные исследования особенностей пассивной корреляционной томографии источников некогерентного акустического излучения мегагерцового диапазона. *Акуст. журн.*, 2006, т. 52, № 5, с. 606-612. [Mirgorodsky V.I., Gerasimov V.V., Peshin S.V. Experimental studies of passive correlation tomography of incoherent acoustic sources in the megahertz frequency band. *Acoustical Physics*, 2006, vol. 52, no. 5, pp. 606-612. DOI: 10.1134/S1063771006050150. (In Russ.)]
6. Krotov E.V., Zhadobov M.V., Reyman A.M., Volkov G.P., Zharov V.P. Detection of thermal acoustic radiation from laser-heated deep tissue. *Appl. Phys. Lett.*, 2002, vol. 81, pp. 3918-3920.
7. Passechnik V.I., Anosov A.A., Bogachev K.M. Fundamentals and prospects of passive thermoacoustic tomography. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 2000, vol. 28, no. 3-4, pp. 603-640.
8. Аносов А.А., Пасечник В.И., Исрефилов М.Г. Восстановление двумерного распределения внутренней температуры модельного объекта методом пассивной термоакустической томографии. *Акуст. журн.*, 1999, т. 45, № 1, с. 20-24. [Anosov A.A., Passechnik V.I., Isrefilov M.G. Reconstruction of a two-dimensional distribution of the internal temperature of a modal object by passive thermoacoustic tomography. *Acoust. Phys.*, 1999, vol. 45, pp. 14-18 (In Russ.)].

9. Anosov A.A., Kazansky A.S., Subochev P.V., Mansfel'd A.D., Klinshov V.V. Passive estimation of internal temperatures making use of broadband ultrasound radiated by the body. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 2015, vol. 137, no. 4, pp. 1667-1674.
10. Anosov A.A., Subochev P.V., Mansfeld A.D., Sharakhshane A.A. Physical and computer-based modeling in internal temperature reconstruction by the method of passive acoustic thermometry. *Ultrasonics*, 2018, vol. 82, pp. 336-344.
11. Barcroft H., Edholm O.G. The effect of temperature on blood flow and deep temperature in the human forearm. *The Journal of physiology*, 1943, vol. 102, no. 1, pp. 5-20.
12. Захарченко И.И., Пасечник В.И. Кинетика тепловых процессов в мышце человека. *Биофизика*, 1991, т. 36, № 4, с. 655-659. [Zakharchenko I.I., Pasechnik V.I. Kinetics of heat processes in human muscle. *Biofizika*, 1991, vol. 36, no. 4, pp. 655-659. PMID: 1793751. (In Russ.)]
13. Герасимов В.В., Гуляев Ю.В., Миргородский В.И., Пешин С.В., Сабликов В.А. Диагностика систем терморегуляции человека с помощью акустотермометра (на примере исследования икроножной мышцы). *Радиотехника и электроника*, 1993, т. 10, pp. 1904-1911. [Gerasimov V.V., Gulyaev Yu.V., Mirgorodsky V.I., Peshin S.V., Sablikov V.A. Diagnostics of human thermoregulation systems using an acousto-thermometer (using the example of a study of the gastrocnemius muscle). *Radiotekhnika i Elektronika*, 1993, vol. 38, no. 10, pp. 1904-1911. (In Russ.)]
14. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Курятникова Н.А., Мансфельд А.Д. Акустотермометрические данные о кровотоке и теплопродукции в предплечье при физической нагрузке. *Акуст. журн.*, 2013, т. 59, № 4, pp. 539-544. [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazansky A.S., Kuryatnikova N.A., Mansfeld A.D. Acoustic thermometric data on blood flow and thermal output in forearm under physical pressure. *Acoustical Physics*, 2013, vol. 59, no. 4, pp. 482-487. DOI: 10.1134/S1063771013040027. (In Russ.)]
15. Pennes H.H. Analysis of tissue and arterial blood temperatures in the resting human forearm. *Journal of applied physiology*, 1948, vol. 1, no. 2.
16. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Дворникова М.В., Дворникова В.В., Казанский А.С., Курятникова Н.А., Мансфельд А.Д. Акустотермометрическое восстановление профиля глубинной температуры с использованием уравнения теплопроводности. *Акуст. журн.*, 2012, т. 58, № 5, с. 592-597. [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Dvornikova M.V., Dvornikova V.V., Kazanskii A.S., Mansfel'd A.D. Acousto-thermometric recovery of the deep temperature profile using heat conduction equations. *Acoustical Physics*, 2012, vol. 58, no. 5, pp. 542-548. DOI: 10.1134/S1063771012030037. (In Russ.)]
17. Lakhssassi A., Kengne E., Semmaoui H. Modified Pennes' equation modelling bio-heat transfer in living tissues: analytical and numerical analysis. *Natural Science*, 2010, vol. 2, no. 12, p. 1375.
18. Дигурова И.И. Влияние гипертермии и иммобилизации на деформируемость эритроцитов у крыс. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, с. 47-50. [Digurova I.I. An influence hyperthermia and immobilization on erythrocyte deformability at rats. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2017, vol. 2, pp. 47-50 (In Russ.)]
19. Аносов А.А., Пасечник В.И., Бограчев К.М. Пассивная термоакустическая томография кисти руки человека. *Акуст. журн.*, 1998, т. 44, № 6, с. 725-730. [Anosov A.A., Bograchev K.M., Pasechnik V.I. Passive thermoacoustic tomography of a human hand. *Acoustical Physics*, 1998, vol. 44, pp. 629-634. (In Russ.)]
20. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Мансфельд А.Д., Шаракшанэ А.С. Определение динамики изменения температуры в модельном объекте методом акустотермографии. *Акуст. журн.*, 2008, т. 54, № 4, с. 540-545. [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazanskii A.S., Mansfel'd A.D., Sharakhshane A.S. Determination of the dynamics of temperature variation in a model object by acoustic thermography. *Acoustical Physics*, 2008, vol. 54, no. 4, pp. 464-468. DOI: 10.1134/S1063771008040040 (In Russ.)]
21. Pasechnik V.I. Verification of the Physical basis of acoustothermography. *Ultrasonics*, 1994, vol. 32, pp. 293-299.
22. Duck F. *Physical properties of tissue*. London: Academic Press, 1990, 95 p.

MEASUREMENT OF THE INTERNAL HUMAN BODY TEMPERATURE BY MEANS OF PASSIVE ACOUSTIC THERMOMETRY

Erofeev A.V.¹, Anosov A.A.^{1,2}, Sharakshane A.A.², Scherbakov M.I.², Mansfel'd A.D.³¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia*Trubetskaya Str., 8, Bldg. 2, Moscow, 119991, Russia*² V.A. Kotel'nikov Institute of Radio-Engineering and Electronics, RAS*Mokhovaya Str., 11, Bldg. 7, 125009 Moscow, Russia*³ Federal Research Center Institute of Applied Physics, RAS*Ulyanov Str., 46, 603950 Nizhny Novgorod, Russia*

Abstract. The inner (acoustobrightness) temperature in the forearm of volunteers was measured with the passive acoustical thermometry when warming ointments were smeared on the forearm skin. In the first 5-10 minutes, the acoustobrightness temperature was decreased in 3-6 K. After this, the acoustobrightness temperature returned to the level that was before applying the ointment. After that, the acoustobrightness temperature increased when using some ointments, when using other ones, it remained the same and even decreased. We propose that the decrease in the depth temperature was connected that the gel used in the measurements had a room temperature. On the one hand, the application of a "cold" gel to the skin should reduce the superficial blood flow. However, the use of warming ointments blocked temporarily this process. As a result, "cold" blood from the near-surface capillaries flowed into the internal tissues of the forearm, leading to tissue cooling. The effect was taken into account with the heat conduction equation with the bloodstream. We changed the parameter used in the equation, namely the temperature of the inflowing blood. The time dependence of the acoustobrightness temperature calculated using the heat conduction equation is consistent with experimental data.

Key words: *thermal acoustic radiation, equation of thermal conductivity with blood flow, acousto-liquid temperature.*

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КВЧ ОБЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Казаринов К.Д., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Чеканов А.В.

ФГБУН Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН

ул. Введенского, 4, г. Фрязино, 141190, РФ; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. В области изучения биологического действия микроволнового излучения клеточная биология занимает особое место. Клетки, как основные структурные элементы органов и тканей, а также межклеточное взаимодействие, которое, в конечном счете, управляет процессами функционирования, рождения и смерти организмов остаются всегда в центре внимания специалистов. Результаты наших предшествующих экспериментов посвящены изучению влияния микроволнового излучения на клетки человека, находящихся в стрессовом состоянии. Окислительный стресс играет существенную роль при патологических процессах. В тканях окислительный стресс приводит к апоптозу, которому подвергаются не только ядросодержащие клетки, но и безъядерные клетки, такие как эритроциты и тромбоциты. Функционирование тромбоцитов является одной из основных причин сосудистых патологий – клеток кровяного русла. Однако не всегда удается преодолеть агрегацию тромбоцитов и предотвратить развитие тромботических осложнений с помощью антитромбоцитарных препаратов. В данной работе рассматривается один из аспектов применения крайне высокочастотного (КВЧ) в микроволновом диапазоне излучения в медицинских приложениях, а именно, как фактор коррекции нарушений реологических свойств крови в клинической практике. Модулируя с помощью микроволнового излучения активацию тромбоцитов мы, тем самым, можем осуществлять выбраковку различных субпопуляций тромбоцитов. Кроме того, КВЧ излучение за счет влияния на водную среду и структуру мембран тромбоцитов способно ускорить процесс корректировки состояния тромбоцитов. В наших экспериментах обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) инкубировали при комнатной температуре в условиях КВЧ облучения в течение 30 минут и затем измеряли уровень и скорость агрегации тромбоцитов. Результаты наших экспериментов показывают, что КВЧ излучение снижает степень агрегации и угол наклона агрегатограммы по сравнению с контролем при добавлении индуктора ристомидина. Добавление этанола в среду тромбоцитов способствовало дальнейшему снижению контролируемых параметров. Предполагается, что микроволновое облучение, стимулируя увеличение скорости образования свободных радикалов в ОТП, может регулировать агрегационную активность тромбоцитов. Рассматривается механизм обнаруженного эффекта, связанный с усилением апоптоза клеток.

Ключевые слова: КВЧ излучение, межклеточное взаимодействие, обогащенная тромбоцитами плазма, этанол, индукторы агрегации, алкогольная интоксикация, механизм биологического действия КВЧ излучения.

Известно, алкоголь вызывает апоптоз (программируемую смерть клеток) в эукариотических клетках, таких как гепатоциты, нервные клетки, фибробласты роговицы и недавно было показано, что алкоголь стимулирует апоптоз тромбоцитов, что приводит к снижению числа циркулирующих клеток и ухудшает гемостаз *in vivo*. Эти данные показывают возможный патогенез геморрагических симптомов у пациентов с алкогольной интоксикацией [1]. Кроме того, известны литературные экспериментальные данные о влиянии этанола на агрегацию тромбоцитов. Так, при потреблении крысами этанола в течение 21 дня было обнаружено снижение агрегации тромбоцитов [2]. В исследованиях [3] было показано, что снижение уровня холестерина – ЛПВП (липопротеинов высокой плотности) может объяснить только 50% защитного эффекта алкогольных напитков; остальные 50% могут быть частично связаны с уменьшением активности тромбоцитов. Эта антитромбоцитарная активность вина объясняется как этанолом, так и полифенольными компонентами, которыми богаты красные вина.

Представленные в предшествующей нашей публикации [4] результаты по изучению эффектов КВЧ излучения на элементы крови человека свидетельствуют о том, что КВЧ излучение низкой интенсивности в условиях нашего эксперимента способно снизить активность межклеточного взаимодействия. Эффект облучения проявлялся в снижении степени агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем при добавлении индуктора агрегации – ристомидина, а также в уменьшении скорости агрегации тромбоцитов.

Повышенная агрегация тромбоцитов лежит в основе патогенеза большого количества заболеваний. Тромбоциты, как известно, являются одними из основных участников сосудистых катастроф при ишемической болезни сердца (ИБС). Однако не всегда удается преодолеть агрегацию тромбоцитов и предотвратить развитие тромботических осложнений с помощью антитромбоцитарных препаратов. Известно, что апоптозу подвергаются не только ядросодержащие клетки, но и безъядерные клетки, такие как эритроциты [5] и тромбоциты [6].

Попыткой преодолеть некоторые нежелательные явления, связанные с активацией тромбоцитов, а также регламентировать их участие в различных патологических состояниях, обусловлен поиск иных подходов к

проблеме, в том числе и рассмотрение участия в апоптозе этих клеток известных индукторов агрегации: коллагена, арахидоновой кислоты, тромбина, АДФ, ионофора кальция А23187 и др. [7]. Установлен бимодальный характер влияния, в зависимости от величины концентрации индуктора. При низких концентрациях наблюдается активация тромбоцитов, а при высоких – запускается программа апоптоза (транслокация фосфатидилсерина с внутренней поверхности цитоплазматической мембраны на внешнюю, открытие гигантских митохондриальных пор и выход $\text{cyt } c$, каскадная активация каспаз и фрагментация клетки для последующей утилизации фагоцитами). При апоптозе прерываются патологические процессы, приводящие к стимуляции тромбообразования. Модулируя с помощью микроволнового излучения активацию тромбоцитов мы, тем самым, можем осуществлять выбраковку различных субпопуляций тромбоцитов [8].

В данной статье рассматривается только случай низких концентраций индуктора, приводящий к коррекции агрегационной функции тромбоцитов.

Эксперименты проводились *in vitro* на образцах крови, взятых у относительно здоровых доноров в полистирольные вакуумные пробирки с цитратом натрия IMPROVACUTER Кат. № 455689. Кровь, стабилизированную цитратом натрия, центрифугировали 10 минут при 200g со скоростью 1000 оборотов в минуту для получения обогащенной эритроцитами плазмы (ОТП). Далее ОТП отбиралась в чистую пробирку. Оставшуюся плазму повторно центрифугировали в течение 25 минут при 400g со скоростью 2800 оборотов в минуту, для получения бедной тромбоцитами плазмы. Далее БТП отбиралась в отдельную чистую пластиковую пробирку. Образцы хранили при $+37^\circ\text{C}$ не более 3 часов.

После выделения ОТП производился подсчет клеток. Проба была объемом 250 мкл. Количество клеток составляло примерно 300 тыс/мл. Затем добавляли индуктор агрегации - водные растворы ристомидина. Конечная концентрация составляла 0,1 мг/мл.

Для исследования влияния КВЧ на агрегацию тромбоцитов использовался метод агрегометрии. Измерения были проведены на четырехканальном приборе AggRam Helena (Великобритания). Кюветы для данного прибора были из силиконизированного стекла, размер их составлял $8 \times 60 \text{ мм}^2$. Температура инкубации - $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Длина волны, на которой проводились измерения – 650 нм. Для перемешивания использовались магниты с покрытием, размером $3,5 \times 4 \text{ мм}^2$.

Далее регистрировали кинетику агрегации в течение 20 минут. В качестве контроля использовали пробу, которая представляла ОТП с добавлением индуктора. Калибровка прибора осуществлялась с помощью бедной тромбоцитами плазмы. Оценка производилась по изменению светопропускания ОТП, при добавлении индуктора агрегации, в нашем случае ристомидина. После добавления индуктора образуются агрегаты тромбоцитов. Параллельно с этим процессом увеличивается светопропускание до достижения плато, что указывает на необратимую агрегацию. Степень агрегации представляет собой разницу между минимальным и максимальным процентами светопропускания. Скорость агрегации оценивалась по тангенсу угла наклона агрегатограммы [4]. Полученные результаты обрабатывались с помощью программ Excel (Microsoft office) и STATISTICA версия 6, StatSoft Corporation (USA). Для анализа различий количественных признаков в трех и более несвязанных группах использовался статистический критерий Краскелла-Уоллиса ANOVA, в двух несвязанных группах применялся критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Генератор на основе диода Ганна с частотой в диапазоне от 32,9 до 39,6 ГГц (длина волны, соответственно, от 9,1 до 7,6 мм) и мощностью излучения от 3 до 30 мВт использовался в качестве источника микроволнового излучения. Установка микроволнового облучения обеспечивала подведение излучения к исследуемому объекту с помощью волновода сечением $7,2 \times 3,4 \text{ мм}^2$ с согласующими элементами. Осуществлялся контроль режима бегущей волны, мощности микроволнового излучения и длины волны излучения. Образцы подвергались микроволновому воздействию в ближнем поле рупорной антенны, расположенной вертикально, и находясь над ней на расстоянии 6 см от открытого конца рупора, т.е. в ближней зоне облучателя. Образцы перемешивали осторожным встряхиванием каждые 5 мин. Температуру в образцах измеряли с использованием волоконно-оптического микротермодетектора МТ-4МО (Россия) с точностью $0,05^\circ\text{C}$.

Оценка межклеточного взаимодействия производилась по изменению светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы, при добавлении индуктора агрегации, в нашем случае ристомидина. После добавления индуктора образуются агрегаты тромбоцитов, в результате этого процесса увеличивается светопропускание обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТП) до достижения плато, что указывает на необратимую агрегацию. В ходе активации тромбоцитов происходит изменение структуры плазматической мембраны, осуществляется активное перераспределение и движение ионов через мембрану, наблюдается гидролиз инозитольных фосфолипидов, что приводит к присоединению или отсоединению от биомембраны различных белков. Также происходит высвобождение и окисление арахидоновой кислоты и изменение метаболизма циклических нуклеотидов.

На рисунках 1, 2 представлены результаты, показывающие влияние КВЧ в присутствии этанола на степень агрегации и скорость агрегации тромбоцитов. Данные были получены при обработке агрегатограмм здоровых доноров. Как видно добавление 1 мкл этанола вызывало незначительное повышение степени агрегации тромбоцитов, что возможно обусловлено образованием гидроксизильных радикалов, которые являются дополнительными модуляторами тромбоцитарной активности [9, 10].

На основании результатов недавних исследований можно предположить, что активированные тромбоциты образуют две субпопуляции, одна из которых способна эффективно агрегировать, а другая осуществляет

экстернализацию фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны и таким образом ускоряет ход мембранно-

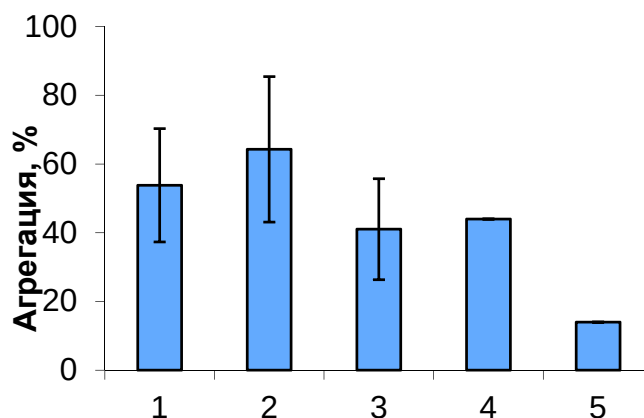


Рисунок 1. Влияние КВЧ на степень агрегации тромбоцитов в присутствии этанола: 1 – ОТП + КВЧ облучение; 2 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 1 мкл; 3 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 2,5 мкл; 4 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 10 мкл; 5 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 15 мкл

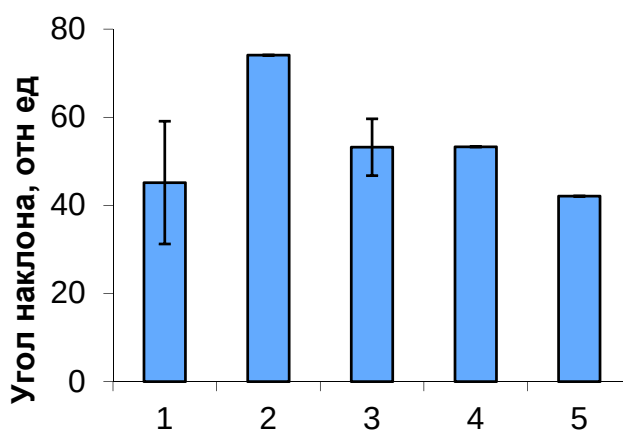


Рисунок 2. Влияние КВЧ на скорость агрегации тромбоцитов в присутствии этанола: 1 – ОТП + КВЧ облучение; 2 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 1 мкл; 3 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 2,5 мкл; 4 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 10 мкл; 5 – ОТП + КВЧ облучение/этанол 15 мкл

зависимых реакций свертывания крови. При этом происходит активация тромбоцитов и увеличение концентрации кальция в его цитоплазме. В дальнейшем происходит аккумуляция кальция в митохондриях до «критического уровня», что является пусковым моментом апоптоза в тромбоцитах. Запускается процесс «митохондриального некроза» тромбоцитов, который сопровождается активным выходом кальция и свободных радикалов из митохондрий, а также деградацией и разрушением цитоскелета, что сопровождается сильным увеличением размера тромбоцитов [11, 12]. В работе [13] было показано, что в активированных тромбоцитах повышается синтез активных форм кислорода. Этанол индуцирует митохондриально-опосредованный внутренний апоптоз тромбоцитов, приводит к снижению количества циркулирующих тромбоцитов. Он вызывает деполяризацию митохондриального внутреннего трансмембранного потенциала, активацию Вах, подавление Bcl-2 и активацию каспазы-3, блокирует поверхностную экспрессию связывания Р-селектина или РАС-1 [1]. Эта последовательность реакций приводит к гибели значительного количества тромбоцитов, участвующих в агрегации и, следовательно, к снижению регистрируемого уровня агрегации и скорости ее нарастания в процессе эксперимента.

Итак, в результате выполнения данной экспериментальной работы было установлено, что КВЧ облучение низкой интенсивности в длинноволновой области снижало уровень агрегации тромбоцитов. Эффект облучения проявлялся в снижении степени агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем при добавлении индуктора агрегации – ристомидина, а также в уменьшении угла наклона агрегатограммы (скорости агрегации тромбоцитов). Добавление в среду этанола способствовало дальнейшему снижению уровня агрегации и угла наклона агрегатограммы в зависимости от количества этанола добавленного в среду инкубации. Предложен механизм наблюдаемого эффекта, связанный с тем, что этанол индуцирует митохондриально-опосредованный внутренний апоптоз тромбоцитов и приводит к снижению количества циркулирующих тромбоцитов. КВЧ излучение за счет влияния на водную среду и структуру мембран тромбоцитов ускоряет этот процесс [14, 15]. Результаты работы открывают перспективы применения КВЧ излучения, как безопасного фактора воздействия с

целью коррекции патологий реологических свойств крови человека и, в частности, при алкогольной интоксикации.

Работа выполнена в рамках государственного задания.

Список литературы / References:

1. Liu L., Chen M., Zhao L., Zhao Q., Hu R., Zhu J., Yan R., Dai K. Ethanol Induces Platelet Apoptosis. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 2017, vol. 42, no 2, pp. 291-298
2. Baysan O., Kaptan K., Erinf K., Oztas Y., Coskun T., Kayir H., Uzun M., Uzbay T., Beyan C., Isik E. Chronic heavy ethanol consumption is associated with decreased platelet aggregation in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 2005, no 2, pp. 85-90
3. Ruf J.C. Alcohol, wine and platelet function. *Biol Res*, 2004, vol. 37, no 2, pp. 209-15.
4. Казаринов К.Д., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Чеканов А.В. Экспериментальные результаты изучения эффектов КВЧ излучения на межклеточные взаимодействия в плазме крови человека. *Электронная техника. СВЧ-техника*, 2019, вып. 2, т. 545, с. 79-86. [Kazarinov K.D., Baranova O.A., Shchelkonogov V.A., Chekanov A.V. Experimental results of studying the effects of EHF radiation on intercellular interactions in human plasma. *Elektronnaya tekhnika. SVCH-tehnika*, 2019, iss. 2, vol. 545, pp. 79-86. (In Russ.)]
5. Birka C., Lang A.P., Kempe S.D. Enhanced susceptibility to erythrocyte «apoptosis» following phosphate. *Eur. J. Physiol*, 2004, vol. 448, pp. 471-477.
6. Leytin V., Mykhaylov S., Starkey A.F. et al. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-GPIIb-induced platelet apoptosis in a murine model of ITP. *Br. J. Haematol*, 2006, vol. 133, pp. 78-82.
7. Alberio L., Safa O., Clemetson K.J., Esmon C.T., Dale G.L. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*, 2000, vol. 95, pp. 1694-702
8. Березовская Г.А. Апоптоз тромбоцитов: причины недостаточной эффективности антитромбоцитарных препаратов. *Бюллетень СО РАМН*, 2011, т. 32, № 4, с. 17-27 [Berezovskaya G.A. Platelet apoptosis: causes of insufficient efficacy of antiplatelet drugs. *Byulleten' SO RAMN*, 2011, vol. 32, no. 4, pp. 17-27. (In Russ.)]
9. Ермолаева Е.Н., Кривохижина Л.В., Кантюков С.А., Сурина-Марышева Е.Ф. Свободнорадикальное окисление в интактных и активированных тромбоцитах. *Фундаментальные исследования*, 2014, № 7-1, с. 61-65. [Ermolaeva E.N., Krivokhizhina L.V., Kanyukov S.A., Surin-Marysheva E.F. Free radical oxidation in intact and activated platelets. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2014, no. 7-1, pp. 61-65. (In Russ.)]
10. Sobotková A., Mášová-Chrastinová L., Suttar J. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events. *Free Radic Biol Med.*, 2009, vol. 47, no. 12, pp. 1707-1714.
11. Терентьева В.А., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Биофизические механизмы контактной активации свертывания плазмы крови. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 5, с. 909-919. [Terentyeva V.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Biophysical mechanisms of contact activation of blood plasma coagulation. *Biofizika*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 909-919. (In Russ.)]
12. Obydeny S.I., Sveshnikova A.N., Ataulakhanov P.M. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2016, vol. 14, no. 9, pp. 1867-1881.
13. Hartwig J.H. The platelet: form and function. *Seminars in hematology*, 2006, vol. 43, no 1, pp. 94-100. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2005.11.004.
14. Казаринов К.Д., Борисенко Г.Г., Полников И.Г. Действие КВЧ низкой интенсивности на окислительные процессы. *Научные труды VIII Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»*, СПб: 2018, с. 43 [Kazarinov K.D., Borisenko G.G., Polnikov I.G. Effect of low-intensity EHF on oxidative processes. *Nauchnyye trudy VIII Mezhdunarodnogo kongressa «Slabye i sverkhslabye polya i izlucheniya v biologii i meditsine»*, St. Petersburg: 2018, p. 43. (In Russ.)]
15. Казаринов К.Д. Исследование мембранотропной активности ЭМИ в широком диапазоне длин волн. *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ – техника*, 2018, Вып. 2, С. 62-75 [Kazarinov K.D. Investigation of the membranotropic activity of electromagnetic radiation in a wide range of wavelengths. *Elektronnaya tekhnika. Ser. 1. SVCH – tekhnika*, 2018, vol. 2, pp. 62-75. (In Russ.)]

STUDYING THE EFFECT OF EHF IRRADIATION ON HUMAN BLOOD CELLS

Kazarinov K.D., Shchelkonogov V.A., Baranova O.A., Chekanov A.V.

Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS (Fryasino branch)

Vvedensky sq., 1, Fryazino, 141190, Russia; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

Abstract. Cell biology occupies a special place in the study of the biological effects of microwave radiation. Cells as the main structural elements of organs and tissues, as well as intercellular interaction, which ultimately controls the processes of functioning, birth and death of organisms are always the focus of attention of specialists. The results of our previous experiments are devoted to studying the effect of microwave radiation on human cells that are under stress. Oxidative stress plays a significant role in pathological processes. In tissues, oxidative stress leads to apoptosis, which affects not only nucleated cells, but also non-nuclear cells, such as red blood cells and platelets. Platelet function is one of the main causes of vascular pathologies. However, it is not always possible to overcome platelet aggregation and prevent the development of thrombotic complications with the help of antiplatelet drugs. In this paper, one of the aspects of the application of extremely high frequencies (EHF) radiation in medical applications is considered, namely, as a factor in the correction of disturbances in the rheological properties of blood in clinical practice. By modulating the activation of platelets with the help of microwave radiation, we can thereby reject various subpopulations of platelets. In addition, EHF radiation due to the influence on the aquatic environment and the structure of platelet membranes can accelerate the process of adjusting the state of platelets. In our experiments, platelet-rich plasma (PRP) was incubated at room temperature under EHF irradiation for 30 minutes, and then the level and rate of platelet aggregation was measured. The results of our experiments show that EHF radiation reduces the degree of aggregation and the angle of inclination of the aggregatogram compared to the control with the addition of the inducer ristomycin. The addition of ethanol to the platelet medium contributed to a further decrease in the monitored parameters. It is assumed that microwave irradiation, by stimulating an increase in the rate of formation of free radicals in PRP, can regulate platelet aggregation activity. The mechanism of the observed effect associated with increased cell apoptosis is considered.

Key words: EHF radiation, intercellular interaction, platelet-rich plasma, ethanol, aggregation inducers, alcohol intoxication, mechanism of the biological action of EHF radiation.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ СВОБОДНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ГЕМОГЛОБИНА ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Слатинская О.В., Максимов Г.В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
ул. Ленинские горы 1 стр. 24, г. Москва, 119892, РФ; e-mail: slatolya@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. В работе рассматривается изменение конформации гемоглобина в эритроцитах и выделенного гемоглобина в условиях нормоксии и гипоксии. Диффузия молекул кислорода и оксида азота через плазматическую мембрану эритроцита зависит от упорядоченности жирнокислотных хвостов фосфолипидов плазматической мембраны и состояния цитоскелета эритроцита, а способность гемоглобина связывать и сбрасывать эти молекулы зависит от его локализации в примембранной области и цитоплазме клетки. Исследование молекулярно-клеточных свойств эритроцитов, важных для осуществления их кислород-транспортной функции возможно с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния (Раман-спектроскопия), при помощи которого возможно проводить регистрацию конформационных изменений гемоглобина эритроцитов *in vitro* и *in vivo*. В работе рассмотрены структурные изменения гема гемоглобина при взаимодействии с лигандами (O_2 или CO_2) при температурном воздействии. Использование лазера с длиной возбуждающего света 532 нм позволило изучить изменения в высокочастотной области спектра ($2800-3100\text{ см}^{-1}$), характерной для изменения симметричных колебаний молекулярных связей -С-Н- метиленовых групп аминокислот глобина, что позволит установить взаимодействия между гемовой и глобиновой частью белка внутриклеточного и свободного гемоглобина. Соотношения полос спектра комбинационного рассеяния позволяют характеризовать динамику изменений конформации гема оксигемоглобина и дезоксигемоглобина при температурном воздействии в диапазоне от 25 до 36 °С. Показано, что изменения конформации различны для молекул гемоглобина в эритроцитах и свободного гемоглобина при температурном и гипоксическом воздействии, но не коррелируют с удельной растворимостью кислорода в растворе.

Ключевые слова: гемоглобин, эритроцит, комбинационное рассеяние.

Эритроцит – высокоспециализированная клетка крови, основная функция которой – транспорт газов из легких к тканям и наоборот. Мембрана эритроцита обладает высоким запасом эластичности, содержит ряд мембраносвязанных ферментов гликолиза, ионотранспортных систем и занимает менее 1% суммарного веса клетки. Основным содержимым эритроцита является примембранный и цитоплазматический гемоглобин, которые участвуют в процессах стабилизации структуры эритроцита и обуславливают внутреннюю текучесть клетки [1, 2]. Гемоглобин (Гб) – хорошо изученный аллостерический белок класса хромопротеинов. Молекула Гб состоит из двух α (141 аминокислотный остаток) и двух β (146 аминокислотных остатков) субъединиц. Субъединицы Гб образуют $\alpha_1\beta_2$ - и $\alpha_2\beta_1$ -димеры за счет гидрофобных взаимодействий [3]. Активный центр, участвующий в связывании лигандов (O_2 , CO_2 и газы метаболического происхождения – NO, CO, H_2S), представлен гемом (протопорфирин IX Fe-комплекс), локализованным в гидрофобной области полипептидных цепей. Атом Fe^{2+} гема координационно связан с 4 атомами азота пиррольных групп плоского порфиринового кольца глобина.

В настоящее время одной из проблем биофизики клетки является детекция структурных изменений мембраны и цитоплазмы при изменении окружающих физико-химических условий среды, которые могут принимать участие в регуляции объема эритроцитов и гемодинамике в сосудах. Так, в условиях кислородного голодания (гипоксия), возникновение которого широко распространено при различных патологических состояниях, связанных с нарушением работы дыхательных и сердечно-сосудистых систем [4], снижается количество дискоцитов, меняется объем клеток, увеличивается деформируемость мембраны эритроцитов [5], а также, происходит изменение конформации молекул Гб, приводящие к снижению сродства к O_2 и отдаче O_2 тканям [6]. В настоящее время, считается, что основной причиной нарушения кислород-транспортной функции эритроцита является изменение конформации гемопорфирина гемоглобина. Известно, что у окси- и дезокси форм Гб различно распределение электронов по внешним оболочкам атома Fe^{2+} . Так, у оксиГб преобладают орбитали со спаренными электронами ($3d^6$), что энергетически выгодно при изменении длины электронных связей с последующими перестройками конформации гема и глобина [2].

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (Раман спектроскопия, КР) хорошо зарекомендовал себя, как метод, при помощи которого возможно проводить регистрацию конформационных изменений гемоглобина эритроцитов *in vitro* и *in vivo*. При смещении области регистрации с «области отпечатков пальцев» ($1000-1700\text{ см}^{-1}$) в высокочастотную область ($2800-3100\text{ см}^{-1}$), становится возможным регистрация сигналов валентных колебаний СН-групп аминокислот гемоглобина и эритроцитарной мембраны [1]. Так, в ряде работ предлагают использовать положение пиков в области $1200-1250$ и $1500-1650\text{ см}^{-1}$ как маркеры для деформации метиновых групп и изменения размера атома Fe^{2+} , соответственно [7-9] Так же, в работах [7, 10] предлагают

Таблица 1. Полосы спектра КР гемопорфирина гемоглобина при возбуждении лазером 532 нм и соответствие полос с колебаниями связей порфирина (оГб – оксигемоглобин, дГб – дезоксигемоглобин) [7, 11-15]

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Связь	Тип симметрии колебаний	Чувствительность колебания	Форма гемоглобина
1172	C _a C _b , C _a N, C _a NC _a	ν_{30} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	оГб
1355	C _{2vinyl} H	ν_4 , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	дГб
1375	C _a C _b , C _a N, C _a NC _a	ν_4 , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда	оГб
1548-1552	C _a C _m , C _a C _m H	A _{2g}	Спиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина	дГб
1580-1588	C _a C _m , C _a C _m H	ν_{19} , A _{2g} асимметричные колебания метиновых мостиков между пирролами	Низкоспиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина	оГб
2850	2 ν_{28} или $\nu_3 + \nu_4$ (1357 + 1473)	A _{1g}	Симметричное растяжение СН	оГб, дГб
2930	2 ν_3	A _{1g}	Симметричное CH ₃ — растяжение. Так же, С-Н-колебания от СН боковой цепи свободной аминокислотной группы. Зависит от изменения внешнего воздействия или температуры	оГб
2940				дГб

использовать полосы 1355 и 1375 см⁻¹ для определения окси- и дезокси-состояния гемоглобина. Так, полоса 1355 см⁻¹ характерна для оГб, а 1375 см⁻¹ для дГб. Согласно таблице 1 интенсивность указанных полос зависит от степени окисления атома Fe и наличия шестого лиганда в симметричных колебаниях пиррольных полуколец C_aC_b, C_aN, C_aNC_a в молекулах оГб и дГб соответственно.

В работе проведено исследование роли конформации глобина в формировании упорядоченности распределения гемоглобина в цитоплазме эритроцита, а также, взаимосвязь изменения конформации белковой и гемовой части гемоглобина при температурном и гипоксическом воздействии.

Исследования проводили на крови добровольцев натошак (n=10, возраст 25-45 лет), которую отирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20-50 Ед/мл крови). После забора, кровь хранили при t = + 4°C.

Форменные элементы крови осаждали центрифугированием при 1500 g в течении 10 минут. Плазму и лейкоцитарный слой отбрасывали, к осадку добавляли среду промывания и инкубации эритроцитов (145 mM NaCl, 5mM KCl, 1mM раствора CaCl₂, 4mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 5 mM глюкозы, pH 7, далее – буфер Аллена) в трехкратном объеме, тщательно перемешивали и центрифугировали (Laborfuge 400R) при 1500 g в течении 5 минут при температуре +4°C. Полученный супернатант отделяли от осадка. Процедуру осаждения эритроцитов повторяли дважды при тех же условиях центрифугирования. К полученной суспензии выделенных эритроцитов добавляли буфер Аллена в трехкратном объеме и хранили при температуре +4 °C не более 3 часов.

Для выделения гемоглобина, к суспензии выделенных эритроцитов в десятикратном объеме добавляли фосфатный буфер (4mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, pH 7,4), после чего раствор тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 g в течении 10 минут при температуре +4 °C. После, супернатант отделяли от осадка и хранили при +4°C. Концентрацию выделенного гемоглобина определяли на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония).

Вытеснение кислорода из пробы с выделенными эритроцитами и пробы с выделенным гемоглобином проводили при помощи газовой смеси азота и 0.04% CO₂ (ПГС-сервис, Россия) при объеме 2 мл (Ht = 40%). Вытеснение кислорода проводилось при комнатной температуре в течении 20 минут при постоянном перемешивании пробы и скорости потока газовой смеси 0.1 л/мин (состояние гипоксии, далее – дГб). Насыщение проб кислородом (состояние нормоксии, далее – оГб) осуществляли параллельно при скорости потока воздуха

0,1 л/мин. Помещение образцов в гематокритные капилляры с диаметром поперечного сечения 1 мм («АгатМед», Россия) проводили в герметичной камере. Контроль парциального давления газовой смеси азота и кислорода осуществляли при помощи платинового электрода. После забора образца, капилляры герметично запаивались и хранились при температуре +4 °С не более 3 часов.

Исследование конформации и свойств гемоглобина проводили при помощи метода спектроскопии комбинационного рассеяния (Раман-спектроскопия, далее – КР) на конфокальном микроскоп-спектрометре NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига 900-3200 см^{-1} с шагом измерения 0,8 см^{-1} , регистратор – CCD детектор с пельтье охлаждением -50 °С (объектив 5х с апертурой 0,15, решетка 600 штр/мм), мощность лазера на образце 3мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15 секунд, количество накоплений сигнала – 3. Спектры КР обрабатывали в программе Origin2017 (OriginLab Corporation, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров. При анализе спектра КР оценивается наличие и положение полос, связанных с образованием комплексов Гб с лигандами и окислением Fe^{2+} до Fe^{3+} . Далее, анализируется соотношение интенсивностей полос спектра согласно таблицы 2.

Результаты и их обсуждение.

При вытеснении кислорода из эритроцитов и выделенного Гб, основные изменения происходят в области отпечатков пальцев, что характеризует переход Гб из расслабленной в напряженную конформацию, при которой связывание кислорода гемоглобином существенно снижается и характерно для гипоксического состояния. Однако, на разностных спектрах оГб и дГб эритроцитов и выделенного Гб (рис. 1, синяя кривая), изменения различны. Так, в области 1500-1650 см^{-1} для выделенного Гб изменения между оГб и дГб более интенсивны, чем у Гб в эритроцитах на $14,20 \pm 0,52\%$. В то время, как разница в области 1300–1400 см^{-1} у выделенного Гб на $16,03 \pm 0,45\%$ выше, чем у Гб в эритроцитах, что характеризует более интенсивное насыщение выделенного Гб O_2 , чем Гб в эритроцитах. Отметим, что при вытеснении кислорода, происходят изменения в высокочастотной области спектра. Вклад в высокочастотной области спектра для оГб в выделенном и эритроцитарном Гб одинаков и составляет 30% от общей интенсивности спектра. В то время, как для дГб происходит изменение вклада от общей интенсивности спектра с 60% для Гб эритроцитов до 70% для выделенного Гб. Данные различия могут указывать как на более жесткое связывание выделенного Гб с CO_2 , так и существенного вклада защитных механизмов у эритроцитов в условиях гипоксии (например, фосфорилирование тирозиновых остатков белков эритроцитов [5]). Таким образом, вклад от аминокислотной части Гб возрастает в условиях гипоксии.

Состояние гипоксии характеризуется изменением способностью Гб связываться с лигандами (в данном случае, с O_2). На рисунке 2 показано, что в условиях гипоксии, конформация молекулы Гб (снижение величины соотношения I_{1375}/I_{1172}) меняется на $51,07 \pm 0,18\%$. Так же, количество оГб снизилось на $50,26 \pm 0,17\%$ в эритроцитах и на $64,83 \pm 0,68\%$ для выделенного Гб. Сродство к O_2 у Гб эритроцитов снизилось на $73 \pm 0,68\%$, у выделенного Гб на $86 \pm 1,23\%$.

При температурном воздействии на образец, происходит изменение конформации Гб в эритроцитах в гипоксическом состоянии на $11,08 \pm 0,54\%$. Так же, незначительные изменения конформации гема Гб происходят у выделенного Гб в гипоксических условиях. Однако, для обоих образцов характерно увеличение количества оГб в гипоксическом состоянии на $26,73 \pm 1,47\%$, так же, меняется сродство к лигандам, что указывает на изменение кислород-связывающей функции. Отметим, изменения более интенсивны для молекул Гб в эритроцитах, чем для молекул выделенного Гб. Увеличение сродства к лигандам характеризует увеличение взаимодействия между молекулами Гб и O_2 , снижая эффективность его отдачи, что характерно для газотранспортной функции эритроцитов. В выбранном диапазоне температур отсутствуют изменения в мембране эритроцита [18]. Таким образом, изменения, наблюдаемые при увеличении температуры обусловлены внутренними системами регуляции эритроцита.

Таблица 2. Соотношение интенсивностей полос спектра КР гемоглобина [7, 16-18]

Отношение пиков спектра	Значение соотношений
I_{1375}/I_{1172}	Групповые колебания связей полуколец пиррола в гемопорфирине, зависит от белкового окружения глобина возле гемопорфирина (характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец). Изменение соотношения, может быть связано с конформационными изменениями пирролов
I_{1580}/I_{1550}	Характеризует сродство гемоглобина к O_2 в пробе, где содержание оГб не меняется. Связано с колебанием метиновых мостиков между пирролами в молекулах Гб, где гемопорфирин растянут и деформирован, либо имеет компактную недеформированную конформацию
$I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$	Относительное количество комплексов оГб
I_{2930}/I_{2850}	Отношение колебаний симметричных колебаний –СН концевых метиленовых групп к несимметричным. Характеризует изменение полярности окружения

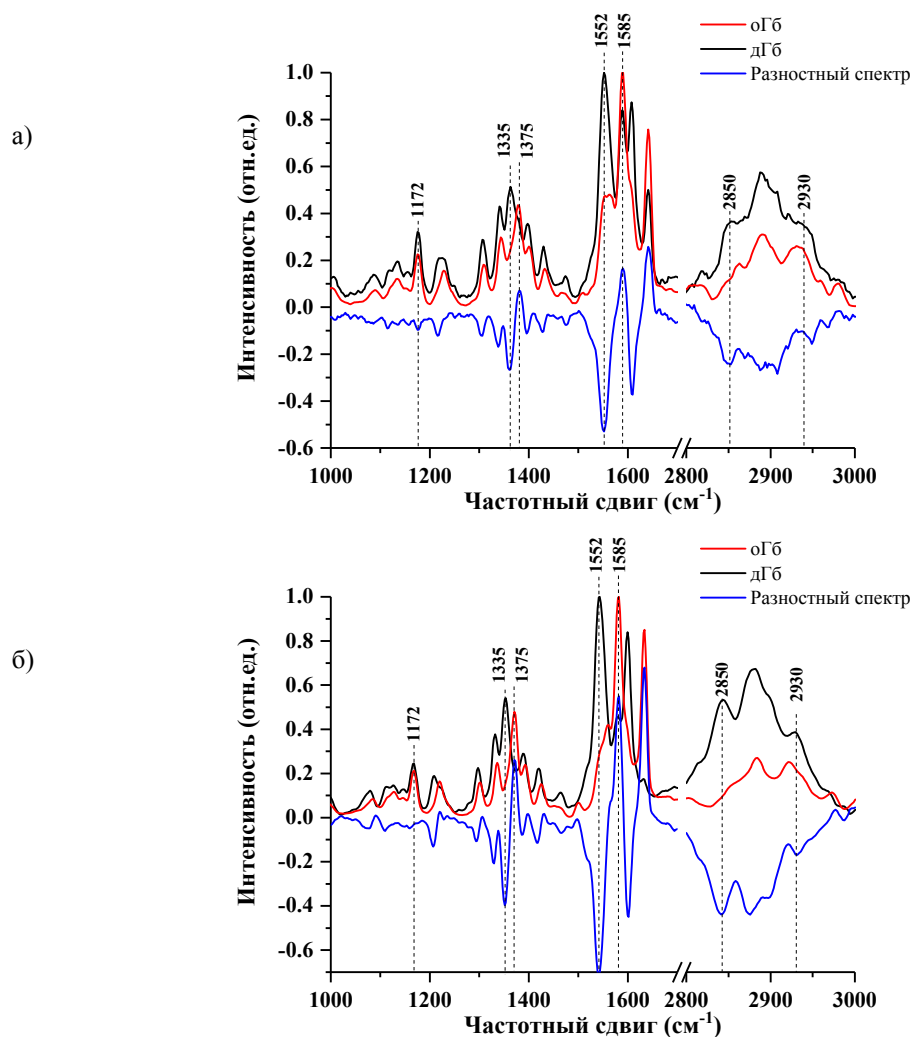


Рисунок 1. Спектры КР для оксигемоглобина (оГб) и дезоксигемоглобина (дГб) для гемоглобина в эритроцитах (а) и выделенного гемоглобина (б) в области отпечатков пальцев (1000-1700 см^{-1}) и высокочастотной области (2800-3000 см^{-1}) спектра. Представленные спектры нормированы на максимум. Синим обозначен разностный спектр между оГб и дГб

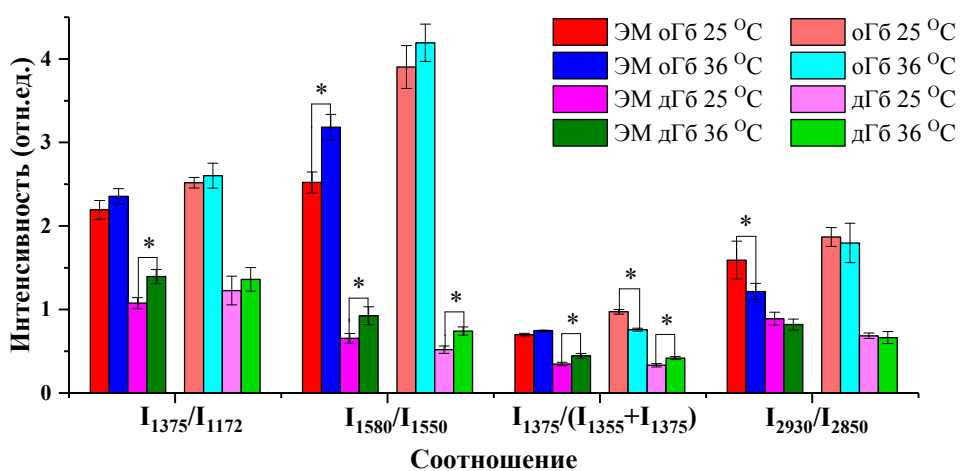


Рисунок 2. Соотношение интенсивностей полос спектра КР для оГб и дГб эритроцитов (ЭМ) и выделенного гемоглобина при комнатной (25°C) и физиологической (36°C) температуре (* – $p \leq 0.05$)

Изменения величины соотношения I_{2930}/I_{2850} свидетельствуют об изменении полярного окружения при условиях гипоксии, что может быть вызвано изменением конформации и изменением pH среды, характерной для оГб и дГб [6]. Отметим, что при увеличении температуры, величина соотношения снизилась на $23,83 \pm 0,75\%$ для молекул оГб в эритроците. Данный эффект отсутствует для других образцов при изменении образцов, что может быть связано с увеличением текучести Гб внутри эритроцитов.

Таким образом, методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано, что изменения симметричных колебаний молекулярных связей -CH- метиленовых групп аминокислот и пиррольных колец гема выделенного и внутриклеточного гемоглобина в диапазоне температур 20-36°C характеризуется различной динамикой при сравнении с конформационными изменениями гема, но не коррелируют с удельной растворимостью O_2 раствора при изменении температуры. Дальнейшее увеличение температуры может приводить к разрушению цитоскелета и изменению конформации Гб, связанной с олигомеризацией молекул Гб, которая также зависит от температуры инкубации эритроцитов.

По мнению авторов, изменения объема или активация рецепторов эритроцита стимулирует процессы изменения конформации в белковых молекулах как в мембране (при изменении вязкости), так и цитоплазматического гемоглобина связано с упорядоченностью гемоглобина в цитоплазме, что способствует эффективному перераспределению кислорода в эритроците.

Список литературы / References:

1. De Rosa M.C., Alinovi C.C., Galtieri A. Allosteric properties of hemoglobin and the plasma membrane of the erythrocyte: New insights in gas transport and metabolic modulation. *IUBMB Life*, 2008, vol. 60, no. 2. DOI: 10.1002/iub.15.
2. Jensen K. Roos B., Ryde U. O-binding to heme: electronic structure and spectrum of oxyheme, studied by multiconfigurational methods. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, vol. 99 no. 1. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2004.11.008
3. Hill R.J. The Structure of Human Hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1962, vol. 237, no. 5.
4. Holly D., Glenn B. Cerebral microvascular dilation during hypotension and decreased oxygen tension: a role for nNOS. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007, vol. 293, no. 4. DOI: 10.1152/ajpheart.00190.2007
5. Wei H.S., Kang H., Rasheed I.Y.D., Zhou S., Lou N., Gershteyn A., McConnel E.D., Wang Y., Richardson K.E., Palmer A.F., Xu C., Wan J., Nedergaard M. Erythrocytes are oxygen-sensing regulators of the cerebral microcirculation. *Neuron*, 2016, vol. 91. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.07.016.
6. Уразова О.И., Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В. *Патофизиология: учеб.: в 2 т. М. : ГЭОТАР-Медиа*, 2012, 304 с. [Urazova O.I., Goldberg E.D., Novitsky V.V. *Pathophysiology*. M: GOATAR-Media, 2012, 304 p.]
7. Goheen S.C., Lis L.J., Kucuk O., Westerman M.P., Kauffman J.W. Study of intact and modified erythrocyte membranes with laser Raman spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy*, 1993, vol. 24, no. 9. DOI: 10.1002/jrs.1250240908.
8. Wood B.R., McNaughton D. Micro-Raman characterization of high- and low-spin heme moieties within single living erythrocytes. *Biopolymers*, 2002, vol. 67, no. 4-5, DOI: 10.1002/bip.10120.
9. Wood B.R., Tait B., McNaughton D. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 2001, vol. 1539, no. 1-2, DOI: 10.1016/S0167-4889(01)00089-1.
10. Wood B.R., Hammer L., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy provides evidence of heme ordering within the functional erythrocyte. *Vibrational Spectroscopy*, 2005 vol. 38, no. 1-2. DOI: 10.1016/j.vibspec.2005.02.016.
11. Parthasarathi N., Hansen C., Yamaguchi S., Spiro T.G. Metalloporphyrin core size resonance Raman marker bands revisited: implications for the interpretation of hemoglobin photoproduct Raman frequencies. *Journal of the American Chemical Society*, 1987, vol. 109, no. 13. DOI: 10.1021/ja00247a009.
12. Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancherri S., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2007, vol. 387, no. 5. DOI: 10.1007/s00216-006-0881-8.
13. Nagatomo S., Nagai M., Mizutani Y., Yonetani T., Kitagawa T. Quaternary structures of intermediately ligated human hemoglobin A and influences from strong allosteric effectors: resonance Raman investigation. *Biophysical journal*, vol. 89, no. 2. DOI: 10.1529/biophysj.104.049775.
14. Choi S., Spiro T.G., Langry K.C., Smith K.M., Budd D.L., La Mar G.N. Structural correlations and vinyl influences in resonance Raman spectra of protoheme complexes and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 1982, vol. 104, no. 16. DOI: 10.1021/ja00380a006.
15. Howell N.K., Arteaga G., Nakai S., Li-Chan E.C. Raman spectral analysis in the C-H stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1999, vol. 47, no. 3. DOI: 10.1021/jf981074l.
16. Camp Jr.C.H., Cicerone M.T. Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. *Nature photonics*, 2015, vol. 9, no. 5. DOI: 10.1038/nphoton.2015.60.
17. Torres Filho I.P., Terner J., Pittman R.N., Proffitt E., Ward K.R. Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation. *Journal of applied physiology*, 2008, vol. 104, no. 6. DOI: 10.1152/japplphysiol.00025.2008.

18. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biophysical journal*, 2009, vol. 97, no. 12. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.09.029.

19. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M., Petrucci T.C., Marchesi V.T. Spectrin involvement in a 40 C structural transition of the red blood cell membrane. *Journal of cellular biochemistry*, 1986, vol. 30, no. 4. DOI: 10.1002/jcb.240300409

EFFECTS OF TEMPERATURE ON CONFORMATIONAL DYNAMIC OF RED BLOOD CELLS AND INTACT HEMOGLOBIN

Slatinskaya O.V., Maksimov G.V.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory 1/24, Moscow, 119892, Russia; e-mail: slatolya@mail.ru

Abstract. The conformational and structure changes of heme side-chains of human hemoglobin in red blood cells and intact hemoglobin upon ligand (O_2 or CO_2) dissociation have been studied by resonance Raman spectroscopy. Resonance Raman spectra of oxygenated and deoxygenated functional red blood cells and isolate hemoglobin recorded using 532 nm laser excitation are presented. The high sensitivity of Raman spectroscopy allows to registration conformation changes of heme (protoporphyrin) and globin part of protein *in vivo* and *in vitro*. We studied the effects of temperature on conformational dynamic changes of intracellular and intact hemoglobin upon hypoxia and normoxia states. We showed modification in the hemoglobin vibration bands in the CH_2/CH_3 stretching bands in the 2800-3100 cm^{-1} region. Spectral profile in the higher spectral region have been assigned to the symmetric / asymmetric CH_2 stretch, and symmetric / asymmetric CH_3 stretch. This study provides new insights into the vibrational dynamics of heme and globin parts within functional red blood cells and solve to cooperative ligand binding mechanism of conformation changes of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin. Ratios from chosen Raman peaks were calculated and compared between the different subjects. We show that conformational and side-chains of hemoglobin in red blood cells and intact hemoglobin do not correlated with oxygen water solubility.

Key words: hemoglobin, red blood cells, Raman spectroscopy.

КОНСТРУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОРТАТИВНЫХ ФОТОБИОРЕАКТОРОВ ДЛЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Романенко С.А.¹, Геворгиз Р.Г.²

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет
пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: sofia.romanenko98@gmail.com

² ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r-gevorgiz@yandex.ru

Поступила в редакцию: 18.07.2019

Аннотация. В работе рассматривается проблема создания автоматизированных портативных фотобиореакторов для культивирования микроводорослей. Создание малогабаритных культиваторов, для работы с которыми не требуется квалификация, особенно актуально, так как среди населения растет спрос на биомассу микроводорослей. Рассмотрены основные требования к конструкции устройства, подходы к проектированию системы с точки зрения современных биологических и технических достижений. Приведены примеры существующих портативных фотобиореакторов, их параметры, преимущества и недостатки.

Ключевые слова: микроводоросли, фотобиореактор, культиватор, хлорелла, спирулина.

Микроводоросли давно уже зарекомендовали себя в качестве перспективного ресурса во многих отраслях производства в мире [1, 2]. Благодаря своему специфическому обмену веществ микроводоросли способны синтезировать уникальные биологически активные вещества (пигменты, белки, жиры, микроэлементы в органической форме). Современные биотехнологии на основе микроводорослей – одно из наиболее стремительно развивающихся направлений. Ежегодно растет спрос на функциональные продукты на основе микроводорослей, а также на биомассу и суспензию клеток. Микроводоросли в основном культивируются с использованием больших фотобиореакторов открытого типа квалифицированным персоналом. Однако далеко не все частные потребители могут себе позволить подобный способ выращивания водорослей. Покупка готовой биомассы также представляется проблемной, так как срок ее хранения во многих случаях весьма ограничен.

Зачастую производство малых объемов микроводорослей происходит в фотобиореакторах закрытого типа. Существующие разработки подходят в основном для работ в лабораториях и требуют постоянного контроля [3, 4]. На сегодняшний день не существует автоматизированной портативной системы для культивирования микроводорослей, которая бы позволила производить биомассу микроводорослей в малых объемах и пригодную для использования в условиях малых фермерских хозяйств, приусадебных участках и пр. Портативность – свойство прибора, заключающееся в компактности его размеров и удобстве переноски для последующей работы – становится важным фактором, обеспечивающим спрос на такое устройство. Для создания подобной системы необходимо учитывать множество факторов. Большое количество работ [5–7] рассматривает влияние каждого фактора отдельно, но такой подход не позволяет разработать систему культивирования в целом из-за отсутствия учета взаимодействия факторов. Поэтому так важно рассмотреть основные аспекты культивирования микроводорослей в совокупности и выделить главные конструктивные особенности портативных систем.

Цель работы – на основе представлений о субстратзависимом росте микроводорослей сформулировать основные требования, предъявляемые при проектировании автоматизированных портативных фотобиореакторов.

В мире описаны рекомендации по созданию промышленных установок для культивирования микроводорослей в больших объемах [8]. Далеко не все из них могут быть применимы к меньшим системам. Кроме того, нужно понимать, что при создании портативной установки внешний вид прибора и удобство его обслуживания играет не меньшую роль, чем внутреннее содержимое [9]. Учет всех основных требований к конструктивному составляющему, как с точки зрения техники, так и биологии позволит создать автономную портативную установку для культивирования биомассы микроводорослей с высокой производительностью.

Рассмотрим основные требования, предъявляемые к объекту культивирования и портативному фотобиореактору.

Объект культивирования. До начала культивирования микроводорослей необходимо убедиться в подлинности рабочего штамма микроводорослей. Следует обратиться к паспорту на культуру, где указана подробная информация о систематическом положении штамма, его световых и температурных характеристиках, питательных средах для культивирования и пр. Исходные культуры можно приобрести в специализированных учреждениях в коллекциях культур микроводорослей.

Метод культивирования. Из множества методов культивирования наиболее простым в реализации является метод накопительных культур. Этот метод не требует специальной системы дозирования, сбора урожая и т.п., поэтому является предпочтительным при проектировании портативных фотобиореакторов. Следует отметить, что при использовании накопительного культивирования себестоимость фотобиореактора значительно ниже в сравнении с фотобиореакторами, позволяющими выращивать микроводоросли другими методами культивирования.

Освещение. Основным параметром, определяющим эффективность процесса культивирования биомассы микроводорослей, является поверхностная облучённость и распределение излучения внутри системы [4–7]. Кроме того, существенную роль играет спектральный состав источника излучения. Поэтому необходимо предъявлять требования к самому излучению с точки зрения биологического воздействия на клетки микроводорослей, так и технические аспекты самого облучателя.

С точки зрения биологического воздействия облучения на биомассу микроводорослей необходимо соблюдение следующих требований:

1. Излучение должно соответствовать области фотосинтетически активной радиации (ФАР), лежащей в пределах от 380 нм до 710 нм. Энергия потока такого излучения наиболее эффективно воздействует на физиологические процессы, происходящие в клетках микроводорослей [10].

2. В спектре источника излучения должны преобладать длины волн, необходимые для нормального функционирования фотосинтетического аппарата микроводорослей. Спектр источника излучения должен быть близок спектру поглощения культуры микроводорослей. Использование излучения с длинами волн, энергия которых не преобразуются в процессе фотобиосинтеза, ведет к снижению эффективности процессов роста и КПД фотобиореактора в целом.

3. Плотность потока от источника излучения должна соответствовать плотности потока, насыщающей фотосинтез для культивируемого вида микроводорослей. В противном случае энергии излучения будет или недостаточно для роста биомассы, или же при избытке будет наблюдаться эффект фотоингибирования, который также замедляет рост биомассы микроводоросли [11].

4. Спектр поглощения суспензии зависит от вида культивируемой микроводоросли. При выборе режима облучения, не учитывающего спектральные свойства выбранной культуры, КПД будущего фотобиореактора также значительно снижается [12].

5. Распределение излучения на рабочей поверхности должно быть равномерным. Клетки микроводоросли в суспензии должны получать одинаковое количество энергии света.

Кроме перечисленных выше параметров, предъявляемых к излучению облучатель должен обладать следующими техническими характеристиками:

1. Светоотдача источника излучения должна быть максимально возможной.

2. Срок службы источника излучения должен быть максимально возможным.

3. Цена источника излучения должна быть минимальной.

4. Нагрев источника излучения в процессе эксплуатации должен быть минимально возможным. Объясняется это тем, что в случае перегрева системы необходимо использовать специальную систему охлаждения. Внедрение в систему фотобиореактора системы охлаждения значительно усложняет конструкцию и увеличивает её стоимость;

5. Класс защиты источника излучения должен быть максимальным. Использование устройства должно быть возможным в различных условиях окружающей среды, например, в сыром помещении, в условиях высокого содержания мелкодисперсных частиц (пыли), в условиях присутствия насекомых и пр.

Культуральная среда. Условия среды культивирования микроводорослей является важной составляющей для роста биомассы. Организация подходящих выбранной культуре условий может определить дальнейшие процессы, которые будут происходить на протяжении всего времени роста микроводоросли.

К среде, содержащей культуру, предъявляются следующие требования:

1. Питательная среда должна быть приготовлена в строгом соответствии с рецептурой для культивируемого вида микроводорослей. Невыполнение этого условия может привести к проблемам с адаптацией, изменению морфологии и гибели микроводорослей [13].

2. Суспензия клеток должна находиться в состоянии непрерывного перемешивания, благодаря чему клетки микроводоросли будут находиться практически в одинаковых условиях, и процесс роста будет максимальным. При перемешивании культуры исключается возможность появления концентрационных ям в околосклеточной среде, также из околосклеточной среды удаляются продукты жизнедеятельности клеток. Кроме того, при перемешивании из суспензии удаляется растворённый кислород и обеспечивается равномерное распределение световой энергии для клеток.

3. Для обеспечения клеток углеродом в среду культивирования должен непрерывно подаваться воздух, причем для достижения приемлемых скоростей роста микроводорослей скорость подачи должна составлять не менее 0,5 л воздуха на 1 л культуры в минуту. Также необходимо обеспечить возможность использования дополнительного источника CO₂ – портативных баллонов (от 15 мл до 2 л) с углекислым газом – с целью уменьшения расхода воздуха.

4. Для повышения эффективности абсорбции углекислого газа воздух в культуральной среде должен проходить через мелкодисперсные распылители для увеличения удельной поверхности пузырьков.

Температура. При интенсивном культивировании биомассы важно, чтобы температура среды, в которой находятся микроводоросли, была оптимальной для используемого штамма. Связано это с тем, что температура оказывает значительное действие на процессы роста, растворимость солей и газа, а также баланс pH [8]. Поэтому важно поддерживать ее на необходимом уровне в течение всего времени культивирования.

Известно, что практически все виды светильников производят достаточно большое количество тепла. В процессе эксплуатации системы происходит неизбежный нагрев устройства и, как следствие, нагрев суспензии. С одной стороны, это нежелательное тепло можно использовать в качестве подогрева суспензии при

культивировании в условиях пониженных температур. С другой стороны, величина подводимого тепла становится избыточной, а это может в значительной степени сказаться на эффективности роста биомассы. По этой причине обычно в фотобиореакторах устанавливают систему терморегуляции, проектирование и интегрирование в систему которых является весьма сложным.

Вопрос обеспечения неизменной оптимальной для микроводорослей температуры в портативных системах остается все еще открытым. Важно отметить, что при пониженных температурах (от 10°C), в отличие от высоких температур (более 40°C) клетки не погибают, скорость их роста лишь замедляется. Поэтому, на наш взгляд, возможно ограничиться проектированием таких конструкций портативных фотобиореакторов, у которых предусмотрена система предотвращения перегрева культуры, но не поддержания температуры в узком оптимальном диапазоне. В таком варианте себестоимость фотобиореактора будет минимальной.

Материалы и покрытия. Так как некоторые детали фотобиореактора имеют непосредственный контакт с суспензией важно, чтобы материалы, из которых они изготовлены, а также их покрытия удовлетворяли предъявляемым требованиям. Кроме того, устройство в целом должно быть изготовлено с применением материалов, не представляющих опасность при эксплуатации.

Материалы и покрытия, используемые при изготовлении портативного культиватора должны соответствовать следующим требованиям:

1. Материалы и покрытия деталей, имеющих непосредственный контакт с суспензией микроводорослей, должны быть химически инертны (нерастворимы в щелочной и кислой среде, а также нерастворимы в концентрированных растворах солей).

2. Материалы и покрытия сосуда, содержащего суспензию, должны быть прозрачны для излучения в области ФАР (коэффициент поглощения материала минимален), отражение излучения от источника поверхностью сосуда должно быть минимальным. Потери излучения от источника света в фотобиореакторах происходят не только на поверхности [14], но и при попадании излучения на саму суспензию, что приводит к значительному снижению КПД культиватора. Для решения этой проблемы необходимо использовать материалы и покрытия, которые будут максимально пропускать излучение, чтобы эффективно использовалась его энергия.

3. Материалы и покрытия, контактирующие с суспензией клеток должны характеризоваться минимальной адгезией для снижения вероятности обрастаний поверхности фотобиореактора клетками микроводорослей.

Система контроля. Для обеспечения автономности процесса культивирования микроводорослей необходимо, чтобы устройство имело эффективную систему контроля в режиме реального времени. Также желательно, чтобы датчики были бесконтактные, т.е. не имели непосредственного взаимодействия с суспензией. Таким образом, к их конструктивному исполнению будет предъявляться меньше требований, что положительно скажется на стоимости готового устройства. В зависимости от целей культивирования система может иметь несколько вариантов конструктивного исполнения. Датчики должны обеспечивать пользователя необходимой и достаточной для успешного культивирования информацией.

Основные датчики портативного фотобиореактора:

1. Датчик температуры. Диапазон измерения – 0-50°C;
2. Датчик, измеряющий ослабление светового излучения после прохождения через среду. Диапазон измерения – 1-100%. На основе полученных данных должен осуществляться последующий пересчет на единицы концентрации;
3. Датчик нитратов, если готовая суспензия планируется к потреблению человеком. Диапазон измерения – 1-100 мг/л.
4. Датчик pH среды; диапазон измерения – 2-12.

Точность датчиков должна быть максимальной при минимальной стоимости.

Потребляемая мощность. В настоящее время большая часть бытовой техники, к которой можно отнести и портативные фотобиореакторы, производят соответственно классу с наилучшими показателями энергоэффективности. Связано это с непрерывно возрастающим потреблением электрической энергии среди населения. Так как работа культиватора предполагается непрерывная, то есть идет постоянное питание устройство от сети, то устройство должно эффективно экономить энергию. Класс энергопотребления портативного фотобиореактора должен соответствовать А, А+ или А++. Остальные классы энергопотребления не допускаются.

Маркетинг. С экономической точки зрения создание подобной портативной установки будет оправдано только при условии спроса на подобный товар на рынке. Микроводоросли активно используются для подкормки сельскохозяйственных животных, как удобрение для растений, а также имеют весьма высокий потенциал в качестве ценного продукта функционального питания для людей [2].

Рынок портативных культиваторов, для работы с которыми не требуется специализированной квалификации, развит слабо. Связано это со сложностями создания подобных установок и их относительной дороговизной. Для того чтобы разработать такой культиватор, который мог бы быть коммерциализирован, он должен соответствовать следующим требованиям:

1. Компактность, портативность устройства. Благодаря небольшим размерам и эргономичности культиватор может быть использован в разных условиях и помещениях.

2. Приятный внешний вид устройства, интегрирующийся с окружающей обстановкой.

3. Отсутствие необходимости иметь специальную квалификацию для работы с устройством. Контроль оператора за процессом роста биомассы минимален, система работает в автономном режиме и производит контроль параметров в режиме реального времени.

4. КПД устройства должен быть максимален.

5. Устройство не должно включать в себя уникальные компоненты (детали, материалы). Все составные части должны быть в доступности для потребителя.

На данный момент в мире представлены некоторые варианты портативных устройств для выращивания микроводорослей. В большинстве своем они представляют пилотные проекты и находятся еще на этапе развития, поэтому не все из них поступили в продажу. Рассмотрим наиболее интересные коммерческие культиваторы.

BLOOM. Культиватор BLOOM разработан французской фирмой Alg&You. Проект находится на стадии предзаказа и доступен пока что только во Франции. Культиватор предназначен для выращивания биомассы микроводоросли хлореллы в домашних условиях.

Достоинствами этого устройства являются возможность выращивания нескольких видов микроводорослей, небольшие размеры и простота конструкции. Недостатками являются неэффективное использование освещения, отсутствие информации о состоянии биомассы. В качестве источника освещения используется светодиодная лента белого света, которая содержит в своем спектре длины волн, не эффективные для фотосинтетических процессов. Кроме того, оптический слой сосуда с суспензией слишком велика, поэтому в нем образуются зоны с чрезмерной и недостаточной освещенностью. Также пользователю не доступна информация о состоянии биомассы микроводоросли, что может привести к неверному толкованию результатов. Эти недостатки значительно снижают эффективность культиватора.

Spirugrow. Культиватор Spirugrow разработан итальянской компанией Bentur Srl. Аппарат доступен для заказа в некоторых странах мира. Культиватор предназначен для получения биомассы микроводоросли спироулина в домашних условиях.

Преимуществами этого культиватора является полная автоматизация системы, вывод необходимой пользователю информации на экран и система фильтрации биомассы. Из недостатков стоит отметить большие габариты, малую производительность и дороговизну. В качестве источника освещения также используются светодиоды белого света, что является нерациональным решением.

ELARA st. Культиватор ELARA st является разработкой итальянской компании SOLARIS BIOTECHNOLOGY. Устройство доступно для заказа в любой стране мира. Культиватор предназначен для выращивания водорослей, фототрофных бактерий и растительных клеток. Основными областями применения являются учебно-исследовательские работы, направленные на изучение повышения и понижения производительности культивирования и оптимизации процессов.

Представленный фотобиореактор имеет полностью автоматизированную систему управления, которая может быть легко скорректирована оператором удаленно с помощью специального программного обеспечения. В качестве источника излучения используются светодиодные панели (красный, синий, белый), спектр излучения которого и мощность могут изменяться. Система датчиков обеспечивает оператора всеми необходимыми при культивировании данными. Недостатками описанного устройства являются высокая стоимость установки и излишне большой функционал. Для культивирования биомассы микроводорослей неквалифицированным персоналом (фермер, школьник, садовод) вне лабораторий многие возможности установки являются избыточными.

UTEX ptorobioreactor. Фотобиореактор представляет из себя разработку Техасского университета США. Аппарат доступен для заказа в любой стране мира. Культиватор предназначен для учебно-исследовательских работ по изучению ускорения роста и повышения производительности культивирования биомассы.

В отличие от описанных выше устройств, данный культиватор представляет собой разборную конструкцию, детали которой могут приобретаться по отдельности. Недостатками такого культиватора являются полное отсутствие встроенных в систему датчиков, минимальные исходные функциональные возможности, необходимость приобретать и самостоятельно устанавливать вспомогательные элементы. Преимуществами такого аппарата является возможность изменять устройство, подстраивая его под нужды конкретного потребителя. Оператор будет получать только необходимую в этом случае информацию. Также источник излучения, выполненный в виде платформы со светодиодными RGB панелями, позволяет изменять спектральный состав и мощность излучения.

Таблица 1. Примеры коммерческих культиваторов

Название	BLOOM	Spirugrow
Габариты, мм	177x332x235	430x430x360
Производительность, г/сут	5-10	20
Вид микроводоросли	Хлорелла, Спирулина	Спирулина
Цена, тыс. руб.	20	64
Страна	Франция	Италия
Внешний вид		
Название	ELARA st	UTEX photobioreactor
Габариты, мм	655x225x225	260x200x200
Производительность, г/сут	Регулируемая	Регулируемая
Вид микроводоросли	Любой	Любой
Цена, тыс. руб.	100	30
Страна	Италия	США
Внешний вид		

Вывод. На сегодняшний день не существует системы культивирования микроводорослей, которая бы удовлетворяла всем перечисленным требованиям. Важно отметить то, что не существует единой модели распределения освещения внутри фотобиореактора, содержащего в себе суспензию микроводоросли. По этой причине весьма сложно провести количественную оценку эффективности использования источников облучения в культиваторе произвольной формы.

Создание портативного автоматизированного фотобиореактора – актуальная проблема, стоящая перед исследователями. Необходимо создать такую систему, которая бы объединяла в себе достоинства существующих аналогов и учитывала их недостатки. Разработка подобного автоматизированного портативного фотобиореактора сможет стать следующим шагом к решению проблемы масштабирования систем для культивирования микроводорослей. Благодаря этой технологии можно будет добиться упрощения процесса выращивания биомассы и сделать производство дешевым и доступным населению.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ госрегистрации AAAA-A18-118021350003-6), при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «УМНИК-18 (а)» (№ договора 13839ГУ/2018).

Список литературы / References:

1. Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 2004, vol. 65, no. 6, pp. 635-648. DOI: 10.1007/s00253-004-1647-x.
2. Kim S.-K., Chojnacka K. ed. *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. 2 Volume Set. John Wiley & Sons, 2015, 707 p.
3. Мещерякова Ю.В., Нагорнов С.А., Ерохин И.В. Накопительное культивирование микроводоросли хлорелла в закрытом фотобиореакторе. *Наука в Центральной России*, 2015, вып. 2 (14), с. 92-100. [Meshcheryakova Y.V., Nagornov S.A., Erokhin I.V. The cumulative chlorella microalgae cultivation in a closed photobioreactor. *Science in central Russia*, 2015, vol. 14, no. 2, pp. 92-100. (In Russ.)]
4. Алексеев М.А., Арьянова Э.Д., Иванова С.С. Установка для культивирования микроводоросли хлореллы. *Архитекторы будущего: сб. статей*, 2014, с. 377-381 [Alexeev M.A., Aryanova E.D., Ivanova S.S. Device for microalgae Chlorella cultivation. *Architects of the future*, 2014, pp. 377-381. (In Russ.)]
5. Binnal P., Babu N. Statistical optimization of parameters affecting lipid productivity of microalga *Chlorella protothecoides* cultivated in photobioreactor under nitrogen starvation. *South African Journal of Chemical Engineering*, 2017, vol. 23, pp. 26-37. DOI: 10.1016/j.sajce.2017.01.001.
6. León-Saikia G.M., Martí T.C., van der Veena D., Wijffels R.H., Martens D.E. The impact of day length on cell division and efficiency of light use in a starchless mutant of *Tetradismus obliquus*. *Algal Research*, 2018, vol. 31, pp. 387-394. DOI: 10.1016/j.algal.2018.02.027.
7. Edmundson S.J., Huesemann M.H. The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum sp.* *Algal Research*, 2015, vol. 12, pp. 470-476. DOI: 10.1016/j.algal.2015.10.012.
8. Huang Q., Jiang F., Wang L., Yang C. Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 2017, vol. 3, pp. 318-329. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.020.
9. Романенко С.А., Шакиров Е.М., Туранов С.Б. Подходы к созданию культиватора микроводорослей для домашнего использования. *GraphiCon 2018: сб. статей*, 2018, с. 458-459. [Romanenko S.A., Shakirov E.M., Turanov S.B. The concepts of creating a microalgae cultivator for domestic use. *GraphiCon*, 2018, pp. 458-459. (In Russ.)]
10. Геворгиз Р.Г., Малахов А.С. *Пересчёт величины освещённости фотобиореактора в величину облучённости*. Севастополь: Колорит, 2018, 60 с. [Gevorgiz R.G., Malakhov A.S. *Conversion of the illumination quantity of photobioreactor into the irradiance quantity: educational methodology manual*. Sevastopol: Kolorit, 2018, 60 p. (In Russ.)]
11. Владимиров М.Г., Семенов В.Е. *Интенсивная культура одноклеточных водорослей*. М: Акад. наук СССР, 1962, 59 с. [Vladimirova M.G., Semenenko V.E. *Intensive culture of unicellular algae*. M: Akad. SSSR, 1962, 59 p. (In Russ.)]
12. Геворгиз Р.Г., Шматок М.Г., Лелеков А.С. Расчет КПД фотобиосинтеза у низших фототрофов. 1. Непрерывная культура. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 31-36. [Gevorgiz R.G., Shmatok M.G., Lelekov A.S. Calculation coefficient of efficiency photobiosynthesis at lower phototroths. 1. Continuous culture. *Marine ecology*, 2005, vol. 70, pp. 31-36. (In Russ.)]
13. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей. Учебное пособие*. Уфа: Изд-во БГПУ, 2008, 152 с. [Gaisina L.A., Fazlutdinova A.I., Kabirov R.R. *Modern methods of algae development and cultivation. Educational guidance*. Ufa: Izd-vo BGPU, 2008, 152 p. (In Russ.)]
14. Ahsan S.S., Pereyra B., Jung E.E., Erickson D. Engineered surface scatterers in edge-lit slab waveguides to improve light delivery in algae cultivation. *Opt. Express*, 2014, vol. 6, no. 21, pp. 1526-37. DOI: 10.1364/OE.22.0A1526.

CONSTRUCTION FEATURES FOR PORTABLE MICROALGAE CULTIVATORS**Romanenko S.A.¹, Gevorgiz R.G.²**¹ National Research Tomsk Polytechnic University

Lenina ave., 30, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: sofia.romanenko98@gmail.com

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

Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

Abstract. The problem of fully-automated portable photobioreactor for microalgae biomass cultivation creating was reviewed. The creation of a small-scale cultivators, which can be used without special qualification, is currently important, due to the growth of interest to microalgae biomass among the population. The most basic requirements to the construction of a device were specified, biological and technical concepts of system creation were discussed. Existed portable photobioreactors were described, their main parameters, advantages and disadvantages were reviewed.

Key words: microalgae, photobioreactor, cultivator, *Chlorella*, *Spirulina*.

ЛАБОРАТОРНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПОЧВ ВИНОГРАДНИКОВ

Завьялова О.С., Ластовенко О.Р., Лисютин В.А., Лучин В.Л., Петренко Н.В.,
Рогова О.В., Рыбакова К.А., Ярошенко А.А.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 18.07.2019

Аннотация. Виноградарство – одно из приоритетных направлений экономического развития Крыма и Севастополя. Сорт, почва и климат считаются тремя основными компонентами терруара. К физическим свойствам почвы относятся гранулометрический и агрегатный состав, структурное состояние, объемная масса, пористость, гидравлическая проницаемость и др. На почвах с низкой проницаемостью вследствие недостаточного дренажа и аэрации растения недополучают не только влагу, но и кислород, что может привести даже к гибели растений. Чтобы правильно корректировать физические свойства почв виноградников необходимо сначала правильно их измерить. Статическая (для постоянной скорости течения) гидравлическая проницаемость определяется посредством известного закона Дарси. Приводится конструкция пермеаметра постоянного напора. Выводится рабочая формула для измерения проницаемости. Показывается, что преимущество пермеаметра предложенной конструкции заключается в том, что отбор разности давлений осуществляется непосредственно из среды, что исключает ошибки, связанные с потерей напора при прохождении сеток и фильтров. Приводится формула Козени-Кармана и графики, по которым осуществлялась калибровка пермеаметра. Определяется Козени-константа для стеклянных шариков. Показывается, что источником ошибки являются флуктуации упаковки.

Ключевые слова: гидравлическая проницаемость, пермеаметр, Козени-Кармана соотношения.

ВВЕДЕНИЕ

Виноградарство – одно из приоритетных направлений экономического развития Крыма и Севастополя [1]. Сорт, почва и климат считаются тремя основными компонентами терруара.

К физическим свойствам почвы относятся гранулометрический и агрегатный состав, структурное состояние, плотность или объемная масса, плотность или удельная масса твердой фазы почвы, пористость, гидравлическая проницаемость, воздушные, водные, тепловые, электрические и радиоактивные свойства почвы [2].

На плотных почвах, с низкой проницаемостью, вследствие недостаточного дренажа и аэрации, растения недополучают не только влагу, но и кислород, что может привести даже к гибели растений, особенно если они страдают длительное время от дефицита питания. В таких условиях происходит отмирание корневых волосков, возобновление же нормального питания может произойти только при образовании новых. В условиях уплотненной почвы семена практически не прорастают или прорастают со значительным запозданием и неравномерностью по срокам. При этом выращивание на склонах или неровностях почвы многократно увеличивает опасность потери урожая – поверхностные потоки воды не успевают впитываться в почву вследствие её уплотнения и, соответственно, уменьшения проницаемости и при своём движении вниз по склону захватывают и сносят в низины плодородный слой почвы и посевов.

Решить указанные выше проблемы можно, используя регуляторы проницаемости почвы. Основой для этих регуляторов является водорастворимый полиакриламид или простой песок. Регулятор позволяет снизить водную эрозию почвы, одновременно увеличивая ее проницаемость.

Чтобы правильно регулировать и корректировать физические свойства почв виноградников необходимо сначала правильно их измерить.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ И ФИЗИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ

Методы измерения гранулометрического состава, плотности и пористости хорошо разработаны [метод] и обсуждаться здесь не будут. Наоборот, для измерения проницаемости требуется специальное оборудование, которое конструируется, оснащается и изготавливается индивидуально, однако результат измерения должен соответствовать стандарту.

Статическая (для постоянной скорости течения) гидравлическая проницаемость определяется через посредство закона Дарси [3, 4]:

$$u_{av} = \frac{\kappa}{\eta} \frac{\Delta p}{\Delta x}, \quad (1)$$

где κ – проницаемость, м^2 ; u_{av} – осредненная по поперечному сечению скорость течения жидкости, м/с ; η – динамическая вязкость жидкости, $\text{Па}\cdot\text{с}$; Δp – разность давлений на расстоянии Δx , измеренная внутри среды, Па/м .

Рассмотрим установившееся ламинарное течение жидкости по цилиндрической трубе диаметром D . Измеряемый тем или иным способом массовый расход флюида связан со средней скоростью соотношением

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = \frac{\rho_f \Delta V}{\Delta t} = \rho_f S u_{av}, \quad (2)$$

где $S = \pi D^2/4$ – площадь поперечного сечения трубы. Сравнивая (1) и (2), получаем физическую формулу для вычисления проницаемости:

$$\kappa = \frac{\eta \Delta m \Delta x}{\rho_f S \Delta t \Delta p} = \frac{\eta \Delta V \Delta x}{S \Delta t \Delta p}. \quad (3)$$

Уравнение (3) составляет формальное решение поставленной задачи.

КОНСТРУКЦИЯ ПЕРМЕАМЕТРА

Пермеаметр представляет собой настольную разборную конструкцию (рис. 1).

Корпус пермеаметра (1) изготовлен из прозрачной акриловой трубы с изменяемой длиной, внутренним диаметром 53 мм. Внутри трубы помещается образец среды (2). Нижний конец трубы закрыт и отделен от среды проницаемой сеткой, не влияющей на результат измерений. Верхний конец трубы открыт, чтобы образец среды можно было уплотнять и воздействовать на него внешним давлением, засыпая сверху крупный кварцевый песок. Бак с водой (3) соединен с трубой пермеаметра гибким шлангом. Если бак и труба расположены на одном уровне, то без внешнего давления уровень воды внутри трубы устанавливается согласно закону сообщающихся сосудов. Внешнее избыточное давление воздуха в водяном баке создается электрическим насосом (4) и регулируется с помощью стабилизатора избыточного давления (5). При включении насоса возникает ток флюида и перепад давления внутри среды, измеряемый дифференциальным манометром (6), $\Delta p = \rho g \Delta h$. Вода стекает в измерительный цилиндр (7) так, что за время измерения Δt набирается Δm или ΔV флюида.

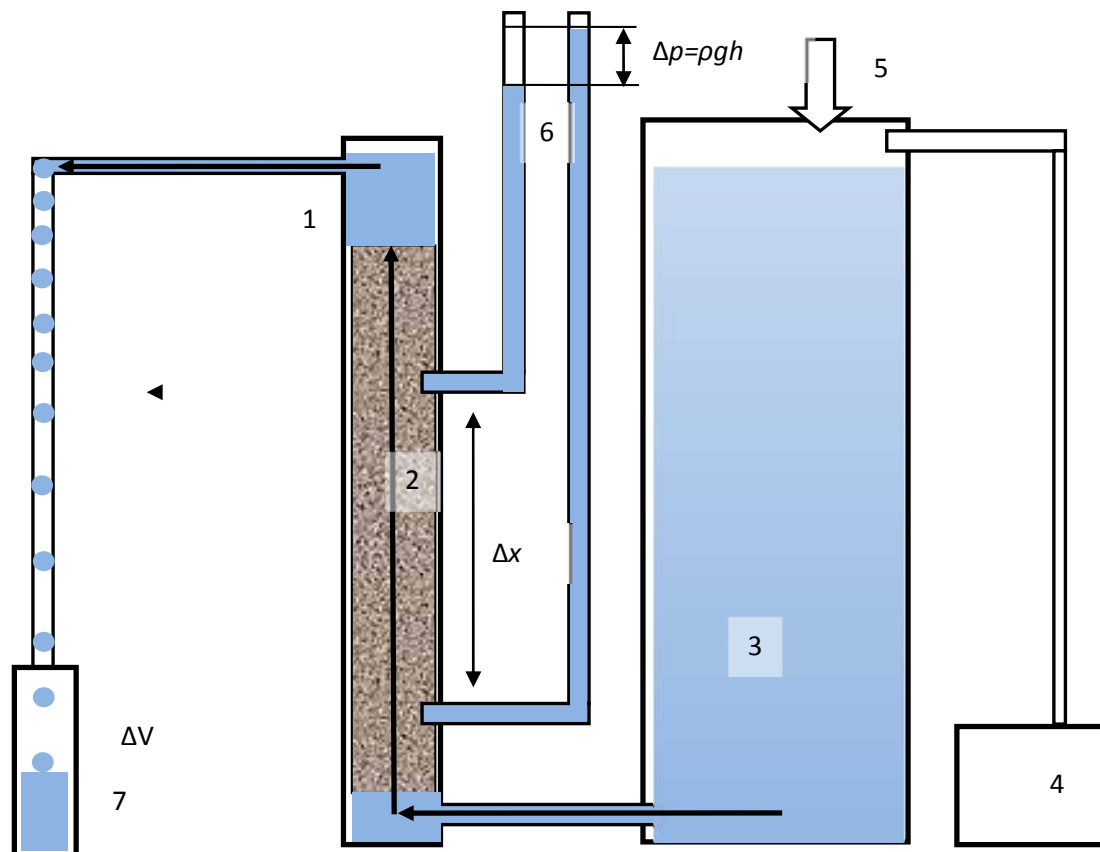


Рисунок 1. Конструкция пермеаметра постоянного напора

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ И КАЛИБРОВКА

Согласно стандарту ASTM – 220 принято первоначально определять коэффициент проницаемости (скорость течения, м/с). Преобразуем формулу (3) следующим образом:

$$\kappa = \frac{\eta}{g\rho_f} \frac{\Delta V \Delta x}{S \Delta h \Delta t} = \frac{\eta}{g\rho_f} k, \quad (4)$$

где $k = \frac{\Delta V \Delta x}{S \Delta h \Delta t}$ – коэффициент проницаемости, определяемый только геометрическими параметрами; g – ускорение свободного падения.

Плотность флюида при температуре измерений должна определяться экспериментально, вязкость жидкости приводится к температуре 20° С с помощью формулы $\eta = 0,000183/(1 + 0,0337t + 0,000221t^2)$, где t – температура в °С.

Калибровка пермеаметра осуществлялась двумя способами: по измерению проницаемости среды из шариков различного диаметра и по измерению проницаемости песка с различным гранулометрическим составом. Авторы располагали шариками единственного диаметра – 6 мм. Проверка осуществлялась на основе уравнения Козени-Кармана [3-5]

$$\kappa = \frac{1}{36K} \frac{P^3}{(1-P)^2} d^2, \quad (5)$$

где P – пористость, d – диаметр шариков, K – Козени константа. В случае случайной упаковки пористость не зависит от диаметра шариков и составляет $P = 0,363$. Козени-константа в этом случае равна $K = 5$. Результат измерений проницаемости сред из шариков различного размера, взятыми из открытой печати, в том числе из [5], и собственных измерений показан на рисунке 2.

Зеленая линия соответствует значению $K = 3$, красная $K = 8$. Как видно, результаты собственных измерений находятся между двумя линиями, соответствующими пределам доверительного интервала. Для объяснения разброса экспериментальных точек на рисунке 3 приведены значения пористости, соответствующие экспериментальным точкам на рисунке 2 и инвертированные значения Козени-константы, вычисленные предполагая $P = 0,363$.

Как видно из рисунка 3, главным источником погрешности являются флуктуации упаковки. Крупные шарики, сосредоточенные в небольшом объеме стремятся упаковаться более плотно (измерения [5]), чего нельзя допускать.

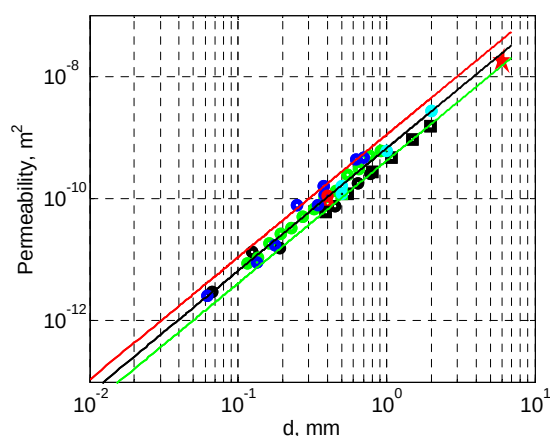


Рисунок 2. Зависимость проницаемости среды из шариков от диаметра. Красная звезда – собственные измерения

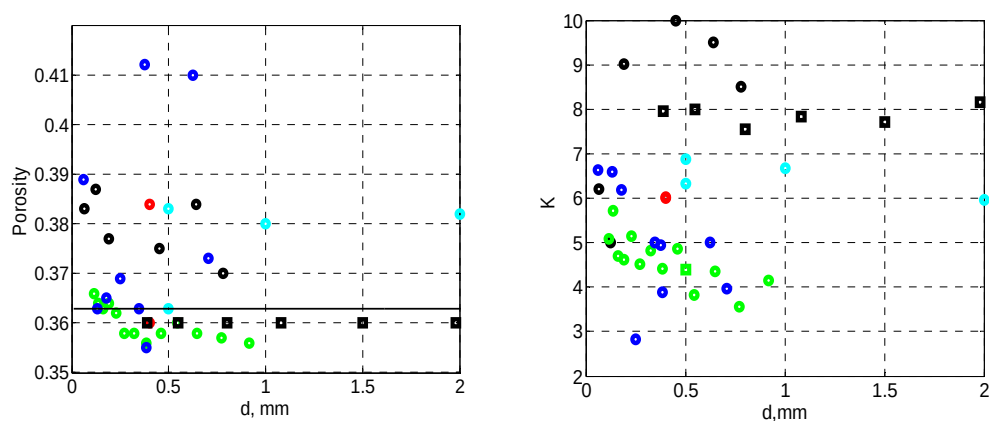


Рисунок 3. Разброс пористости и Козени – константы от диаметра шариков

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преимущество пермеаметра предложенной здесь конструкции заключается в том, что отбор разности давлений осуществляется непосредственно из среды, что исключает ошибки, связанные с потерей напора при прохождении сеток и фильтров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и города Севастополь в рамках научного проекта № 18-42-920001.

Список литературы / References:

1. Гайсарова А.А., Филипенко Н.Ю. О проблемах и перспективах развития отраслей виноградарства и виноделия Республики Крым. *Агропродовольственная экономика: научно-практический электронный журнал*. Нижний Новгород: НОО «Профессиональная наука», 2017, № 01, с. 90-99. [Gaisarova A.A., Filipenko N.Yu. On the problems and prospects of development of the viticulture and winemaking sectors of the Republic of Crimea. *Agricultural and food economics: a scientific and practical electronic journal*. Nizhny Novgorod: The NGO Professional Science, 2017, no. 01, pp. 90-99. (in Russ.)]
2. Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А. *Методы определения физических свойств почв и грунтов*. М.: Высшая школа, 1961, 345 с. [Vadyunina A.F., Korchagina Z.A. *Methods for determining the physical properties of soils and soil*. M.: Higher School, 1961, 345 p. (In Russ.)]
3. 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.)]
4. 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. 26, no. 1, pp. 77-91. DOI: 10.22449/1573-160X-2019-1-77-91.]
5. Kimura M. Prediction of tortuosity, permeability, and pore radius of water-saturated unconsolidated glass beads and sands femur. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2018, vol. 143, no. 5, pp. 3154-3168. DOI: 10.1121/1.5039520.

LABORATORY COMPLEX FOR MEASURING PERMEABILITY OF SOILS OF VINEYARDS
Zavjalova O.S., Lastovenko O.R., Lisyutin V.A., Luchin V.L., Petrenko N.V., Rybakova K.A., Rogova O.V.,
Jarochenko A.A.

Sevastopol state university

Universitetskaya Str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: vlisiutin@mail.ru

Abstract. Viticulture is one of the priorities of the economic development of the Crimea and Sevastopol. Variety, soil and climate are considered the three main components of the terroir. The physical properties of the soil include the granulometric and aggregate composition, structural condition, bulk density, porosity, hydraulic permeability, etc. On soils with low permeability, due to insufficient drainage and aeration, plants receive less than just moisture, but also oxygen, which can even lead to plant death. In order to properly adjust the physical properties of the vineyard soils, it is necessary to first measure them correctly. The static (for a constant flow rate) hydraulic permeability is determined by the well-known Darcy law. The design of the constant head permeameter is given. Displays the working formula for permeability measurement. It is shown that the advantage of the permeameter of the proposed design is that the selection of the pressure difference is carried out directly from the environment, which eliminates errors associated with pressure loss during the passage of the grids and filters. The Kozeny-Carman formula and the graphs used to calibrate the permeameter are given. Determined by Kozeny-constant for glass beads. It is shown that the source of error is the packing fluctuations.

Key words: *hydraulic permeability, permeameter, Kozeny-Carman relation.*

MODIFICATION MECHANISMS OF ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *CHARA FRAGILIS* CELLS UNDER THE INFLUENCE OF GAMMA RAYS AND EXTRACTS OF PHYTOPROTECTORS

Hasanova A.E.

Institute of Botany ANAS

Badamdar shosse 40, Baku, Azerbaijan, AZ1004; e-mail: ahasanova89@gmail.com

Received: 20.07.2019

Abstract. The regularities of changes of not irradiated and irradiated with low doses of radioactive radiation *Chara fragilis* cells membrane potential (φ_m) and resistance (R_m) in the standard conditions and under the influence of extracts of sage, roots of licorice and danaya. has been studied with microelectrode technique. The average value of these parameters were -183 ± 4.9 mV and 9 ± 1.2 Ohm·m² under the standard conditions. For *Chara fragilis* cells irradiated with a low dose of γ - rays, these values were $\bar{\varphi}_m = -202 \pm 9.4$ mV and $\bar{R}_m = 11.7 \pm 3.6$ Ohm·m². The components of the primary active transport system of *Chara fragilis* cells, irradiated with a low dose of γ - rays, turned out to be sensitive to the action of phytoprotectors and the effective concentration, causing a reliable electrophysiological reaction was 1 mg/l. Activation ranges of K⁺ - channels to the inward and outward rectification were $-130 \div -50$ and $-300 \div -162$ mV. The cytosolic activity of K⁺ ions was 61.6 mM / l. Electrophysiological reactions of the PM were qualitatively and quantitatively determined by the initial level of φ_m and the concentration of phytoprotectors.

Key words: plasma membrane, membrane potential, resistance, phytoprotector, γ -radiation, *Chara fragilis*.

The large size of *Chara fragilis* interstitial cells provide wide opportunities for the identification of membrane processes in conditions of their intactness. One of the important aspects of research in this plan is the determination of the cellular mechanisms of the pathogenic and protective effect of some exogenous factors of a physicochemical nature, since the first phase of their influence occurs at the level of the cell membrane. Therefore, the main purpose of these researches was to identify the cellular mechanisms of such interactions by using the results of electrophysiological measurements. For this purpose, we studied the patterns of changes in the functional activity of the components of the primary active transport of plasma membrane (PM) of *Chara fragilis* cells under the influence of these factors. The components of primary active transport system of PM consist mainly of 2 types of K⁺ - channels and H⁺ - pumps. Control of the functional activity of these components was carried out by regular measurement of membrane potential (φ_m) and resistance (R_m) of *Chara* cells, both under standard environmental conditions and under the influence of the above mentioned exogenous factors.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted on internodal cells of *Chara fragilis* collected from a pond called “Katib Bulagy”, which formed from sewage water of several mountain springs in the Tovuz region. The *Chara fragilis* cells were for the first time used in the electrophysiological research by us. The species and families of algae were determined by the Gollerbach determinant [1]. It turned out that, *Chara fragilis* belongs to the family of *Characeae* Ag. Emand Hollerb of *Charophyceae* class [1]. The bioelectric parameters of *Chara fragilis* cells were measured by using standard microelectrode techniques [2]. The essence of this method is that the registration of the parameters φ_m and R_m is carried out by introducing 2 microelectrodes into the cylindrical interstitial cell *Chara* [2]. Through one microelectrode introduced into the center of the cell, the direct current pulses with a density of 10^{-4} A/m² in a duration of 2-3 seconds was transmitted. Via the second microelectrode was recorded the φ_m of cell and the electrotonic potential ΔU generated by passing a direct current through the cell. R_m of cells is calculated by the formula $R_m = \frac{\Delta U}{I} \pi dl$, where I – strength of current transmitted through the middle of the cell, l, d – the length and the diameter of the experimental cell.

The use of this method allows the measurement of the potential and resistance of the PM and tonoplast by introducing a measuring microelectrode into the cytoplasm and vacuole.

In this study plant extracts from the flora of Azerbaijan which are rich with antioxidants are used as a phytoprotector. As raw materials for the extracts were used sage leaves (*Folia Salvia officinalis*), liquorice roots (*Radix glycyrrhizae*) and danae leaves (*Danae racemosa*). These phytoprotectors revealed antioxidant, antimicrobial and antimutagenic, hypoglycemic and hypolipidemic features [3-8]. The screening of alcoholic extracts of dried plant: sage leaves with predominant content of saponins (ursolic oleanic acid, carotene, vitamin C), roots of liquorice with saponine – glycyrrhizin and leaves of *Danae racemosa* with predominant content of carotenoids [9, 10] was performed. The extraction of crumble material was undertaken with 95% ethanol during 7 days in the dark and at room temperature. To clarify the extracts, they were filtered. The concentration of the extracts, which caused the most effective electrophysiological reaction, was obtained by diluting the alcohol extract 200 times with artificial pond water (APW). This concentration can be expressed as $2 \text{ mg}/10 \cdot 200 \text{ ml} = 10^{-3} \text{ mcg/ml} = 1 \text{ mg/l}$.

For the testing of the action of small doses of γ - radiation, *Chara fragilis* cells are located in a glass test tube with a 100 mm length and 25 mm diameter inside a steel sleeve in the γ - device "URI". The exposure time in our experiments was 2 min 55 s, the average radiation dose rate was 19 rad/s, and the dose rate of ^{60}Co isotopes was 33.25 Gy/s. It should be noted here that the concept of "low dose", the dose causing a statistically significant bioelectric "effect" may not coincide [4].

The laws of variation statistics, the computer programs Excel-2016 and SigmaPlot12.0 were used for plotting of graphs.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The stationary values of φ_m and R_m scattered in a rather wide range: $-90 \div -300$ mV and $1 \div 32,6$ Ohm $\cdot$ m ^{2} , respectively. According to these values, the average values of the potential and the resistance of the membrane were $\bar{\varphi}_m = -183 \pm 4,9$ mV и $\bar{R}_m = 9 \pm 1,2$ Ohm $\cdot$ m ^{2} . Measurements of φ_m and R_m were held in 106 and 45 cells, respectively. A detailed description of the statistical analysis of the electrophysiological parameters of these cells are given in our previous publications [12, 13].

The average values of membrane potential and resistance of *Chara fragilis* cells irradiated with a low dose of γ - rays were $\bar{\varphi}_m = -202 \pm 9,4$ mV ($n=17$) и $\bar{R}_m = 11,7 \pm 3,6$ Ohm $\cdot$ m ^{2} ($n=15$). Thus, as a result of irradiation, the absolute value of φ_m of *Chara fragilis* cells increased by 10,4%, and R_m - by 18,2% (Fig. 1). These figures show that the ion - transport system of cells irradiated with a low dose of γ - rays is represented mainly by K^+ -channels of inward rectification (KCIR). As seen, the adaptive response of *Chara fragilis* cells to a low dose of γ - rays consists of the inactivation of the K^+ -channels of outward rectification (KCOR) and the activation of the KCIR PM, which is accompanied by its hyperpolarization. Membrane potential is the main source of free energy of PM. Consequently, the hyperpolarizing effect of the γ - rays dose is a manifestation of the energization of the PM. On the other hand, it is also a manifestation of radiation hormesis in plant objects. The exact mechanisms of these effects on plant objects have not been established. Obviously, in this case, the energization of the PM occurs due to the restriction of the leakage of ions through the small resistance of the KCOR. In all likelihood, an increase in the productivity of some agricultural crops and the stimulation of cellular processes [11] under the influence of low doses of radioactive radiation occurs due to the restructuring of the primary active transport system leading to the energization of the PM.

The components of the primary active transport system of *Chara fragilis* cells, irradiated with a low dose of γ - rays, turned out to be sensitive to the action of phytoprotectors. Their effective concentration, causing a reliable electrophysiological reaction was 1 mg/l. For an objective quantitative representation of the kinetics of the electrophysiological effects of phytoprotectors, the results of our measurements obtained for 10 cells were averaged (by using the computer program SigmaPlot 14.0).

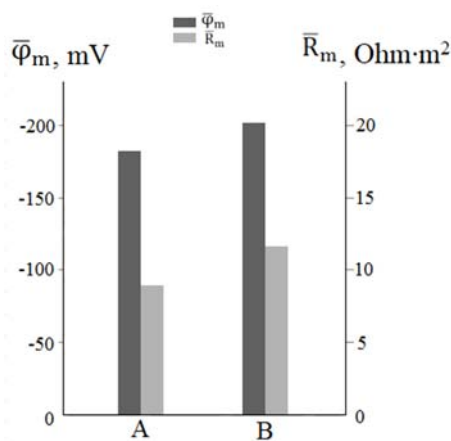


Figure 1. The histogram of average values ($\bar{\varphi}_m$ and $\bar{R}_m$) of electrophysiological parameters of *Chara fragilis* algal cells under standard environmental conditions (A) and irradiated with a low dose of γ - rays (B)

During the introduction of 1 mg/l the concentration of sage extract into the medium, in *Chara fragilis* cells, which φ_m was in the activation range of KCIR, φ_m did not change, while R_m decreased by 17% (fig. 2). In other words, the adaptive response of the PM of *Chara fragilis* cells apparently reflects the repair of the KCOR channel protein under the influence of the protector. At the same time, the PM remains in the energized state. The exact identification of this case can be established by using bioinformatic methods.

The introduction of liquorice root extract into the medium after washing the sage extract led to depolarization of PM by 11 mV and an increase in $\bar{R}_m$ by 25%. Undoubtedly, this electrophysiological reaction of PM is the result of the combined action of both protectors. Introduction to the medium of the mentioned concentration of the *Danae racemosa* extract hyperpolarized *Chara fragilis* cells by 12 mV and reduced $\bar{R}_m$ by 15%. Changes of $\bar{\varphi}_m$ and $\bar{R}_m$ are signs of partial

activation of H^+ - pumps of PM. Therefore, it can be established that in the range of KCIR of membrane potential the resistance of H^+ - pump and KCIR are comparable.

If the hyperpolarization of the PM is accompanied by a decrease in its resistance, then it can only be associated with a decrease in the internal resistance of H^+ - pump. The decrease of the KCIR resistance would be accompanied by depolarization of the PM. Thus, the activation of H^+ - pump should be considered as a proton flux gain, through the PM. It can be assumed that the stimulating effect of phytoprotectors is due to an increase in fluidity (decrease in viscosity) of the lipid phase of PM, leading to an increase in the mechanical frequency of the hydrophobic part of the H^+ - pump, accompanied by an increase in the turnover of the protein complex as an enzyme.

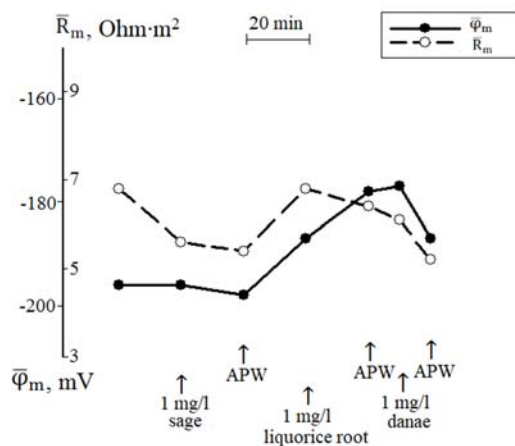


Figure 2. Changes in the kinetics of average values of membrane potential $\bar{\phi}_m$ and resistance $\bar{R}_m$ of *Chara fragilis* cells under the influence of 1 mg/l of concentrations of extracts of sage, roots of licorice and danaya. The dots in the figure show the average values of the experimental quantity for 10 cells. The standard deviation of their values did not exceed 8-9% of the main value

In conclusion, we note that the stimulation of transport processes under the influence of phytoprotectors at the PM level was also found on cells that were not exposed to radioactive radiation [14, 15].

Data on the effect of phytoprotectors on PM cells irradiated with a low dose of γ - rays confirmed the previously established position that the initial phase of phytoprotectors influence at the cellular level can be considered as a stimulating effect on the primary active transport system. The established stimulating effect consists in increasing the functional activity of the H^+ - pump, which increases the mobility of the electromotive force of the primary active transport system and in improving the perfection of the membrane in relation to selectivity and conductivity.

Along with all the above, it is easy to see that plant extracts used as a phytoprotector can be successfully applied to the stimulation of the transfer of ions to PM, and their protective effects can be successfully applied to radiation protection of plants not irradiated and irradiated with low doses of radioactive radiation.

References:

1. Gollerbach V.I., Krasavina L.K. *Qualifier of freshwater algae of the USSR*. Leningrad.: Science, 1983, 185 p. (In Russ.)
2. Hogg J., Williams E.J., Jhonston R.I. A simplified method for measuring membrane resistances *Nitella translucens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1968, vol. 150, p. 518.
3. Ahmad Ghorbani Mahdi Esmaeilzadeh, Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2017, vol. 7, iss. 4, pp. 433-440.
4. Jedinák A., Mucková M., Kost'álová D., Maliar T., Masterova I. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. *Z. Naturforsch.*, 2006, vol. 61, pp. 777-782.
5. Russo A., Formisano C., Rigano D. *et al.* Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Toxicol*, 2013, vol. 55, pp. 42-47.
6. Asl M.N., Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza sp.* and its bioactive compounds. *Phytother Res.*, 2008, vol. 22, no. 6, pp. 709-724. DOI: 10.1002/ptr.2362.
7. Shahreari Sh., Khaki Arash, Ahmadi-Ashtiani H.R., Rezazadeh Sh. Effects of *Danae racemosa* on testosterone hormone in experimental diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*, 2010, pp. 114-119.
8. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. *China journal of Chinese materia medica*, 2009, vol. 34, no. 21, pp. 2695-700.
9. Dadasheva S.B., Kurbanova I.M., Varfolomeev S.D., Gasanov R.A. Photodestruction of isolated chlorophyll – protein complexes of thylakoids. *Photosyntetica*, 1990, vol. 24, no. 2, pp. 280-282.
10. Kerimov Yu.V. The useful properties of some plants from flora of Azerbaijan. *Proceedings of the Azerbaijan National Academy of Sciences, biology series*, 1982, vol. 1, pp. 16-21. (In Russ.)

11. Ivanovsky Y.A. Radiation hormesis. Are low doses of ionizing radiation beneficial? *Bulletin of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2006, no. 6, p. 86. (In Russ.)
12. Hasanova A., Najafaliyeva Sh., Aliyeva P., Musayev N. Electrophysiological parameters of the cell membrane and plasma membrane of *Chara fragilis* cells. *Advances in Biology & Earth Sciences, Jomard Publishing*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 60-68. (In Russ.)
13. Hasanova A., Najafaliyeva Sh., Aliyeva P., Musayev N. *Chara fragilis* cells – a new object for electrophysiology research. *Baku Engineering University. Chemistry and Biology*, 2018, vol. 2, no. 1, pp. 8-14.
14. Hasanova A.E., Shamilov E.N., Abdullayev A.S., Musayev N.A. The influence of dandelion and burdock phytocomposition on the potential of the plasma membrane of *Chara fragilis* cells. *New and non-traditional plants and prospects for their use, materials of the XI International Symposium*, June 15-19, 2015, Pushino, Moscow, pp. 203-206. (In Russ.)
15. Hasanova A.E., Najafaliyeva Sh.A. The fitoprotectors influence on electrophysiological parameters of *Chara fragilis* cells. *Conference of young scientists and students Innovations in biology and agriculture to solve global challenges*, Baku, Azerbaijan, October 31, 2018, p.145.