

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 4, № 3
2019**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 4, № 3
2019**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 4, No. 3, 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, № 3, 2019

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

Ф.А. Сакибаев, С.М. Макин, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Анализ степени гомологии аминокислотных последовательностей гликозид-гидролаз из различных продуцентов..... 311

А.А. Замятнин, Т.А. Белозерская

Размер природных линейных пептидных структур..... 315

В.А. Королева, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Исследование физико-химических и кинетических свойств бромелина в свободном и иммобилизованном состояниях 322

А.Д. Воротнов, А.И. Цареградская, Л. Лианг, А.В. Юдинцев, А.Б. Костюк, А.В. Звягин

Влияние поверхностного покрытия антистоксовых нанопосфоров на коллоидную стабильность в растворах трансферрина..... 327

С.В. Беспалова, Д.В. Кладько, Ю.А. Легенький, В.Н. Павлов, В.А. ГлазуноваВлияние низкочастотного переменного магнитного поля на жизнеспособность магнитомаркированных клеток *Saccharomyces cerevisiae* 335**С.С. Сороко, А.В. Юдинцев, А.Б. Костюк, С.А. Лермонтова, В.И. Плеханов, Л.Г. Клапшина, И.В. Балалаева, Н.Ю. Шилягина**

Дозозависимое изменение вязкостных свойств опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии..... 340

Е.В. Семенова, Е.В. Малышко, В.А. Твердислов

О возможной взаимосвязи хиральности лекарственных препаратов и хиральных структур в биомакромолекулах-мишенях 346

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

А.А. Чекушкин, П.Е. Гаврилов, А.С. Лелеков

Автоматический датчик оптической плотности культуры микроводорослей на базе Arduino Nano..... 352

А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, В.А. Твердислов

Детерминированные механизмы естественного отбора как перколяционной решетки 360

А.Я. Гараева, А.Э. Сидорова, В.А. Твердислов

Соотношение самоорганизации и случайных процессов в перколяционной решетке естественного отбора..... 364

А.О. Луценко, А.Э. Сидорова

Количественная оценка хиральности спиральных структур белков..... 369

А.К. Гарсон Дасгупта, А.Н. Свешникова

Математическая модель образования кластеров рецепторов произвольного размера 374

А.В. Брильков, Е.В. Брилькова, В.В. Ганусов, И.В. Жабрун, Ю.Ю. Логинов Экологическая биофизика: опыт математического моделирования динамики трансгенных микробных популяций	378
--	-----

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Е.И. Венская, Г.П. Зубрицкая, Л.М. Лукьяненко, Е.И. Слобожанина Влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на модификацию мембранных белков эритроцитов человека <i>in vitro</i>	383
---	-----

Р.М. Гильфанов, И.А. Черенков, В.Г. Сергеев, И.Л. Иванова Электрохимическое моделирование диффузии катехоламинов в гидрогелевых средах различного состава	389
--	-----

А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич Термическая инаktivация микроорганизмов с использованием высоких возбуждённых состояний фотосенсибилизаторов.....	393
---	-----

Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, Н.Н. Климович, Е.И. Венская, А.Г. Кутько, А.С. Скоробогатова, Л.М. Лукьяненко, Т.И. Козарева Изменение показателей феррокинетики, общей антиоксидантной активности и концентрации лактоферрина в плазме крови детей с железодефицитными состояниями в процессе лечения	398
--	-----

С.М. Панкова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов Действие УФ-излучения на свободные и иммобилизованные трипсин и коллагеназу	405
--	-----

И.И. Хлудеев, М.П. Самцов, Л.С. Ляшенко, А.А. Луговский Фотофизические свойства полиметиновых фотосенсибилизаторов в водном растворе в присутствии белков сыворотки крови	409
--	-----

Д.Ю. Баранов, И.В. Скуратовская, О.В. Рогова, Ю.В. Мухина, А.О. Лантушенко Анализ адаптации школьников к отдыху в детских лагерях с помощью микроядерного теста буккального эпителия	413
---	-----

П.В. Перетягин, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, Г.А. Бояринов, В.И. Сергиенко Исследование локальной микрогемодинамики и окислительного метаболизма крови при длительном воздействии ингаляционного оксида азота в эксперименте	417
--	-----

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

О.Р. Ластовенко, В.А. Лисютин Биологическая активность водорослей и изменчивость акустических характеристик придонного слоя вод моря.....	421
--	-----

Г.И. Морозова, М.А. Козлова, А.А. Акшинцев Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда.....	428
--	-----

Ю.В. Дорошенко Кинетические характеристики роста микроорганизмов перифитона систем гидробиологической очистки	435
--	-----

CONTENTS

Volume 4, No. 3, 2019

GENERAL BIOPHYSICS

- F.A. Sakibaev, S.M. Makin, M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov**
Analysis of the amino-acid sequence homology of glycoside-hydrolase from different producers 311
- F.F. Zamyatnin, T.A. Belozerskaya**
Size of the natural linear peptide structures 315
- V.A. Koroleva, M.G. Holyavka, V.G. Artukhov**
Investigation of the physico-chemical and kinetic properties of bromelain in the free and immobilized state 322
- A.D. Vorotnov, A.I. Tsaregradskaya, L. Liang, A.V. Yudintsev, A.B. Kostyuk, A.V. Zvyagin**
Effect of the surface coating of upconversion nanoparticles on the colloidal stability in transferrin solutions 327
- S.V. Bespalova, D.V. Kladko, Yu.A. Legenkiy, V.N. Pavlov, V.A. Glazunova**
Influence of low-frequency alternating magnetic field on viability of magnetically modified yeast cells 335
- S.S. Soroko, A.V. Yudintsev, A.B. Kostiuk, S.A. Lermontova, V.I. Plekhanov, L.G. Klapshina, I.V. Balalaeva, N.Yu. Shilyagina**
Dose-dependent changes of tumor cell viscosity under photodynamic treatment 340
- E.V. Semenova, E.V. Malyshko, V.A. Tverdislov**
On the possible interrelation of the chirality of drugs and chiral structures in target biomacromolecules 346

MODELLING IN BIOPHYSICS

- Chekushkin A.A., Gavrilov P.E., Lelekov A.S.**
Automatic optical density sensor of microalgae culture on the Arduino Nano basis 352
- A.Y. Garaeva, A.E. Sidorova, V.A. Tverdislov**
Determined natural selection mechanisms like a percolation grid 360
- A.Y. Garaeva, A.E. Sidorova, V.A. Tverdislov**
Ratio of self-organization and random processes in the percolation grid of natural selection 364
- A.O. Lutsenko, A.E. Sidorova**
Quantification of chirality spiral protein structures 369
- A.K. Garzon Dasgupta, A.N. Sveshnikova**
Mathematical model of the formation of clusters of receptors of arbitrary size 374

A.V. Brilkov, E.V. Brilkova, V.V. Ganusov, I.V. Jabrun, Yu.Yu. Loginov

Ecological biophysics: mathematical modelling experience

of transgenic microbial populations dynamics 378

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

E.I. Venskaya, G.P. Zubritskaya, L.M. Lukyanenko, E.I. Slobozhanina

The effect of amyloid fibrils from hen egg white lysozyme

on the membrane proteins modification of human erythrocytes *in vitro* 383

R.M. Gil'fanov, I.A. Cherenkov, V.G. Sergeev, I.L. Ivanova

Electrochemical modeling diffusion of catecholamines

in different composition of hydrogel media..... 389

A.T. Ishemgulov, S.N. Letuta, S.N. Pashkevich

Thermal inactivation of microorganisms using high excited

electronic states of photosensitizers..... 393

E.I. Slobozhanina, G.P. Zubritskaya, N.N. Klimovich, E.I. Venskaya, A.G. Kutko,

A.S. Skarabahatava, L.M. Lukyanenko, T.I. Kozarezova

Changes of indices of ferrokinetics, total antioxidant activity

and lactoferrin concentration in the plasma of children with iron deficiency

in progress of treatment 398

S.M. Pankova, M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov

Action of UV radiation on free and immobilized tripsine and collagenase 405

I.I. Khludayev, M.P. Samtsov, L.S. Lyashenko, A.A. Lugovski

Photophysical property of polymethine photosensitizers behavior in an aqueous solution

in the presence of serum proteins 409

Baranov D.Yu., Skuratovskaya I.V., Rogova O.V., Mukhina Yu.V.,

Lantushenko A.O.

Analysis of adaptation of pupils to rest in children's camps by micronucleus

test of buccal epithelium..... 413

P.V. Peretyagin, A.G. Soloveva, S.P. Peretyagin, G.A. Boyarinov,

V.I. Sergienko

Study of local microhemodynamics and oxidative metabolism of blood

under long-term exposure to inhaled nitric oxide in the experiment..... 417

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

O.R. Lastovenko, V.A. Lisutin

Biological activity of seagrass and variability of acoustic properties

of the bottom layer of the shallow sea 421

G.I. Morozova, M.A. Kozlova, A.A. Akshintsev

Evaluation of the environmental toxicity of aqueous solutions

with low xenobiotics doses on blood donor cells using a potential-sensitive

fluorescent probe 428

Yu.V. Doroshenko

The kinetic growth characteristics of microorganisms of periphyton

of the hydrobiological cleaning systems 435

АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ГОМОЛОГИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЛИКОЗИД-ГИДРОЛАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ

Сакибаев Ф.А., Макин С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Изучена степень гомологии аминокислотных последовательностей гликолитических ферментов: экзоинулиназ ADM21204.1, A.CAC44220.1, EHA22512.1, AHN08014.1, AGR40655.1 и BAC45010.1, эндоинулиназ AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510.1, XP_748286.1, ANY59682.1 и AA02437.1, β -фруктозидаз САА04518.1 и САА52620.1, фруктан-1-экзогидролазы САС37922.1 и фруктозилтрансферазы ADK46938.1. Наибольшая степень идентичности аминокислотных последовательностей среди экзоинулиназ выявлена для ферментов из *A. awamori* и *A. ficuum* (90,88%), наименьшая – между энзимом из *A. niger* с ферментами из *B. licheniformis* и *G. stearothermophilus* (28,29%). Наибольшая степень идентичности для эндоинулиназ выявлена между двумя формами эндоинулиназы из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) и составляет 97,87%, что также является наибольшим показателем для всех представленных в работе ферментов, наименьшая – между ферментами из *A. fumigatus* и *K. marxianus* (27,89%). Наименьший показатель гомологичности среди всех представленных в работе ферментов выявлен между экзоинулиназой из *A. niger* и β -фруктозидазой из *T. maritima* и равен 20,45%. Приведенные в работе данные показывают значительную вариабельность аминокислотного состава карбогидраз, что указывает на широкие возможности их применения в различных условиях промышленного гидролиза инулина.

Ключевые слова: гликозид-гидролазы, гомология, аминокислотные последовательности.

В настоящее время перспективным субстратом для производства фруктозы, используемой в качестве подсластителя и заменителя сахарозы, и фруктоолигосахаридов, выступающих в качестве пребиотиков, является инулин – полидисперсный фруктан, состоящий в основном из β -(2 $\rightarrow$ 1)-D-фруктозил-фруктозных звеньев с терминальным остатком сахарозы [1]. Он служит в качестве запасного полисахарида и накапливается в подземных корнях и клубнях многих растений, таких как топинамбур (*Helianthus tuberosus*), цикорий (*Cichorium intibius*, *Cichorium endivia*), георгин (*Dahlia pinnata*) и т.д. [2]. Использование дешевого и доступного сырья в совокупности с применением катализаторов с высокой степенью активности в значительной степени повышают эффективность производства. В связи с этим большим потенциалом в данной области обладают гликолитические ферменты, катализирующие гидролиз инулина.

Высокая активность энзимов определяется их пространственной организацией и, как следствие, степенью сродства к субстрату. При этом промышленное использование биокатализаторов требует учета оптимальных значений pH и температуры, которые также зависят от структуры фермента.

Было показано, что отношение числа аминокислотных остатков, образующих β -складчатости, к количеству остатков, расположенных в петлях, а также соотношение содержания гидрофобных аминокислотных остатков к гидрофильным отличаются для инулиназ разной природы и с различными оптимальными значениями pH и температуры. Несмотря на то, что прямая корреляция между данными показателями и оптимальными параметрами функционирования инулиназ не наблюдается, исследование аминокислотных последовательностей инулиназ от различных продуцентов представляется полезным на первых этапах изучения структурно-функциональных свойств ферментов [3].

Варьирование состава реакционной среды, конструктивных характеристик реакторов и других условий гидролиза также приводит к необходимости учета особенностей строения энзима.

Известно, что конформационные состояния белков определяются их аминокислотным составом. Так, согласно данным ИК-спектроскопии, инулиназа из *Kluyveromyces marxianus* Y-303 имеет более упорядоченную структуру по сравнению с энзимом из *Aspergillus awamori* BKMФ 2250: у нее наблюдается меньшая протяженность нерегулярных участков и большая протяженность α -спиралей и β -слоев [4]. Поэтому для удовлетворения потребностей, возникающих в связи с условиями проведения реакции, необходимо использование гомологичных ферментов, с одной стороны, способных к осуществлению одного типа реакции, с другой стороны, обладающих необходимыми для данного промышленного процесса параметрами.

Иммобилизованные ферменты обладают рядом преимуществ по сравнению с их свободными формами. Так, связывание молекул энзимов с нерастворимыми носителями позволяет регулировать оптимальные значения pH и температуры и приводит к повышению их стабильности. Установлено, что адсорбция инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на матрице катионита ВИОН КН-1 приводит к увеличению температурного оптимума с 50 до 70°C с сохранением активности на уровне 27,5% от каталитической способности свободного энзима [5, 6].

Таблица 1. Процент идентичности аминокислотных последовательностей гликозид-гидролаз

Анализируемые объекты и ферменты		Экзоинулиназы										Эндоинулиназы						β-фруктозидазы		Фруктан-1-экзогидролаза	Фруктозил-трансфераза
		<i>A. ficum</i>	<i>A. awamori</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. polymyxa</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>T. maritima</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>C. intybus</i>	<i>A. japonicus</i>						
Экзоинулиназы			90,88	39,92	37,15	35,84	37,12	35,34	35,65	33,9	32,52	30,98	28,69	26,22	25,18	23,12	40				
	<i>A. awamori</i>	90,88		40,08	37,55	34,68	35,3	34,56	34,37	32,89	33,27	30,39	28,1	26,27	25,09	21,11	40				
	<i>A. niger</i>	39,92	40,08		29,55	28,89	28,89	33,33	47,06	23,08	23,08	47,06	42,86	20,45	42,86	30,00	27,27				
	<i>P. polymyxa</i>	37,15	37,55	29,55		49,58	34,93	35,67	34,23	33,81	31,52	32,15	32,8	31,88	26,82	24,82	27,85				
	<i>B. licheniformis</i>	35,84	34,68	28,89	49,58		37,1	35,41	29,01	31,09	29,39	29,39	29,54	28,94	27,33	29,71	21,12				
Экзоинулиназы	<i>G. stearothermophilus</i>	37,12	35,3	28,89	34,93	37,1		32,66	34,01	33,81	32,72	33,27	34,36	31,36	27,43	26,05	28,48				
		35,34	34,56	33,33	35,67	35,41	32,66		94,63	93,04	62,08	60,12	29,37	27,18	25,88	25,8	35,59				
	<i>A. niger</i>	35,65	34,37	47,06	34,23	29,01	34,01	94,63		97,87	63,53	63,8	29,89	28,42	25,41	25,32	27,33				
		33,9	32,89	23,08	33,81	31,09	33,81	93,04	97,87		62,94	63,19	28,63	29,63	25	25,76	28,32				
	<i>A. fumigatus</i>	32,52	33,27	23,08	31,52	29,39	32,72	62,08	63,53	62,94		68,17	27,89	28,16	23,87	24,33	25				
Эндоинулиназы	<i>F. oxysporum</i>	30,98	30,39	47,06	32,15	29,39	33,27	60,12	63,8	63,19	68,17		29,62	27,31	26,3	25,81	44,44				
	<i>K. marxianus</i>	28,69	28,1	42,86	32,8	29,54	34,36	29,37	29,89	28,63	29,63	29,62		30,79	27,03	26,48	25,15				
	<i>T. maritima</i>	26,22	26,27	20,45	26,82	27,33	27,18	25,41	25,32	25,76	28,32	28,32	28,32	28,32	28,32	28,32	22,06				
	<i>A. thaliana</i>	25,18	25,09	42,86	26,82	27,33	27,43	26,05	25,8	25,32	25,76	28,32	28,32	28,32	28,32	28,32	22,06				
β-фруктозидазы	<i>T. maritima</i>	26,22	25,09	20,45	26,82	27,33	27,18	25,41	25,32	25,76	28,32	28,32	28,32	28,32	28,32	28,32	22,06				
	<i>A. thaliana</i>	25,18	25,09	42,86	26,82	27,33	27,43	26,05	25,8	25,32	25,76	28,32	28,32	28,32	28,32	28,32	22,06				
Фруктан-1-экзогидролаза	<i>C. intybus</i>	23,12	21,11	24,82	29,71	26,05	25,8	25,32	25,76	24,33	25,81	26,48	29,94	49,4	49,4	49,4	24,73				
Фруктозил-трансфераза	<i>A. japonicus</i>	40	40	27,27	27,85	21,12	35,59	27,33	28,32	25,15	22,06	21,6	24,73	24,73	24,73	24,73					

Необходимо отметить, что от пространственной структуры молекул фермента, а также от состава и локализации аминокислот на их поверхности зависит эффективность иммобилизации. В связи с вышеизложенной целью настоящей работы является выявление степени идентичности аминокислотных последовательностей карбогидраз из различных продуцентов.

В качестве объектов исследования были использованы экзоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (ADM21204.1), *A. awamori* (CAC44220.1), *A. niger* (EHA22512.1), *Paenibacillus polymyxa* (AHN08014.1), *Bacillus licheniformis* (AGR40655.1) и *Geobacillus stearothermophilus* (BAC45010.1), отщепляющие терминальные остатки фруктозы, эндоинулиназы из *A. niger* (AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510.1), *A. fumigatus* (XP_748286.1), *Fusarium oxysporum* (ANY59682.1) и *Kluyveromyces marxianus* (CAA02437.1), β -фруктозидазы из *Thermotoga maritima* (CAA04518.1) и *Arabidopsis thaliana* (CAA52620.1), фруктан-1-экзогидролаза из *Cichorium intybus* (CAC37922.1) и фруктозилтрансфераза из *A. japonicus* (ADK46938.1) [7-21]. Анализ идентичности представленных в работе ферментов проводили с помощью программы BLAST [22].

В таблице 1 приведены показатели гомологичности представленных в работе гликозидаз друг другу. Среди экзоинулиназ наибольшая степень идентичности аминокислотных последовательностей выявлена для ферментов из *A. awamori* и *A. ficuum* и равна 90,88 %. Гомологичность инулиназы из *A. niger* с ферментами из *B. licheniformis* и *G. stearothermophilus* в обоих случаях составляет 28,29% и является наименьшим значением в группе экзоинулиназ. При этом последние идентичны друг другу на 37,1%.

Две формы эндоинулиназы из *A. niger* (ABB59681.1 и EHA19510.1) идентичны на 97,87%. Данный показатель является наибольшим для всех обсуждаемых в работе гликозидаз. При этом наименьшее значение идентичности в данной группе, составляющее 27,89 %, показывают ферменты из *A. fumigatus* и *K. marxianus*.

Аминокислотные последовательности β -фруктозидаз из *T. maritima* и *A. thaliana* идентичны друг другу на 32,27%.

Наименьшие значения идентичности с другими представленными в работе ферментами выявлены для экзоинулиназы из *A. niger*. Так, степень гомологии данного белка с одной из форм эндоинулиназы из того же продуцента (EHA19510.1) и энзимом из *A. fumigatus* составляет 23,08%. Кроме того, идентичность экзоинулиназы из *A. niger* β -фруктозидазе из *T. maritima* равна 20,45%, что является наименьшим показателем для всех описанных в работе ферментов.

Приведенные в работе данные показывают значительную вариабельность аминокислотного состава гликозид-гидролаз, что указывает на широкие возможности их применения в различных условиях промышленного гидролиза инулина.

Список литературы / References:

1. De Leenheer L. Production and use of inulin: industrial reality with a promising future. *Carbohydrates as organic raw materials*, 1994, vol. 3, pp. 67-92, DOI: 10.1002/9783527614899.
2. Gupta A.K., Kaur N. Fructan storing plants: a potential source of high fructose syrups. *Journal of scientific & industrial research*, 1997, vol. 56, no. 8, pp. 447-452.
3. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A. Structural and functional properties of inulinases. Ways to regulate their activity. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 493–501, DOI: 10.1134/S0006350913040039.
4. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. Исследование структурных особенностей инулиназ из различных продуцентов методом ИК-спектроскопии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2011, № 1, с. 3-7. [Kovaleva T.A., Holyavka M.G. the research of structure features of inulinases from various producers by the method of IR-spectroscopy. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 2011, no. 1, pp. 3-7 (In Russ.)]
5. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С. Исследование иммобилизации инулиназы на ионогенных и неионогенных носителях. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 2007, т. 7, № 5, с. 804-810. [Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Taha A.S. Investigation of inulinase immobilization on ionogenic and nonionogenic carriers. *Sorbatic and chromatographic processes*, 2007, vol. 7, no. 5, pp. 804-810. (In Russ.)]
6. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Karpov S.I., Seredin P.V., Artyukhov V.G. Investigation of mechanisms of interaction between inulinase from *Kluyveromyces marxianus* and the matrices of ion exchange resins and fiber. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 223-229. DOI: 10.1134/S0006350914020122.
7. Chapman J.W., Musters W., Rouwenhorst R.J., Toschka H.Y., Verbakel J.M. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA02437.1>.
8. Andersen M.R., Salazar M.P., Schaap P.J., van de Vondervoort P.J., Culley D., Thykaer J., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Albang R., Albermann K., Berka R.M., Braus G.H., Braus-Stromeyer S.A., Corrochano L.M., Dai Z., Dijck P.W., Hofmann G., Lasure L.L., Magnuson J.K., Menke H. [et al.] Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome research*, 2011, vol. 21, no. 6, pp. 885-897. DOI: 10.1101/gr.112169.110.
9. Gao J., Xu Y.Y., Yang H.M., Xu H., Xue F., Li S., Feng X.H. Gene cloning, expression, and characterization of an exo-inulinase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2014, vol. 173, no. 6, pp. 1419-1430. DOI: 10.1007/s12010-014-0950-y.

10. Tsujimoto Y., Watanabe A., Nakano K., Watanabe K., Matsui H., Tsuji K., Suzuki Y. Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *Applied microbiology and biotechnology*, 2003, vol. 62, no. 2-3, pp. 180-185. DOI: 10.1007/s00253-003-1261-3.
11. Nierman W.C., Pain A., Anderson M.J., Wortman J.R., Kim H.S., Arroyo J., Berriman M., Abe K., Archer D.B., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulson R., Davies R., Dyer P.S., Farman M., Fedorova N., Fedorova N., Feldblyum T.V. [et al.] Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 2005, vol. 438, no. 7071, p. 1151. DOI: 10.1038/nature04332.
12. Chen H.Q., Chen X.M., Li Y., Wang J., Jin Z.Y., Xu X.M., Xie Z.J. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, 2009, vol. 115, no. 4, pp. 1206-1212. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.067.
13. Arand M., Golubev A.M., Neto J.B., Polikarpov I., Wattiez R., Korneeva O.S., Chepurayeva, O.V. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochemical Journal*, 2002, vol. 362, no. 1, pp. 131-135. DOI: 10.1042/bj3620131.
14. Wang J.-H., Teng D., Yao Y. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN64131.1>.
15. Yang J.K., Zhang J.W., Mao L., You X., Xiong W. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ANY59682>.
16. Yuan X.L., Goosen C., Kools H., van der Maarel M.J., van den Hondel C.A. J., Dijkhuizen L., Ram A.F. Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 2006, vol. 152, no. 10, pp. 3061-3073. DOI: 10.1099/mic.0.29051-0.
17. Lu W.-D. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGR40655.1>.
18. Liebl W., Brem D., Gotschlich A. Analysis of the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, vol. 50, no. 1, pp. 55-64. DOI: 10.1007/s002530051256.
19. Schwebel-Dugué N., El Mtili N., Krivitzky M., Jean-Jacques I., Williams J.H., Thomas M., Lecharny A. *Arabidopsis* gene and cDNA encoding cell-wall invertase. *Plant physiology*, 1994, vol. 104, no. 2, p. 809.
20. Van den Ende W., Michiels A., Van Wouterghem D., Clerens S.P., De Roover J., Van Laere A.J. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology*, 2001, vol. 126, no. 3, pp. 1186-1195. DOI: 10.1104/pp.126.3.1186.
21. Yao Y.H., Hsieh Y.Y., Hsieh C.Y., Lin C.H., Chiang C.M. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADK46938.1>.
22. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 1997, vol. 25, no. 17, pp. 3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.

ANALYSIS OF THE AMINO-ACID SEQUENCE HOMOLOGY OF GLYCOSIDE-HYDROLASE FROM DIFFERENT PRODUCERS

Sakibaev F.A., Makin S.M., Holyavka M.G., Artyukhov V.G.

Voronezh State University

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

Abstract. We studied the homology of amino acid sequences of glycolytic enzymes: exo-inulinases ADM21204.1, A.CAC44220.1, EHA22512.1, AHN08014.1, AGR40655.1 and BAC45010.1, endo-inulinases AAN64131.1, ABB59681.1, EHA19510.1, XP_748286 .1, ANY59682.1 and AA02437.1, β -fructosidases CAA04518.1 and CAA52620.1, fructan-1-exohydrolase CAC37922.1 and fructosyltransferase ADK46938.1. The highest amino acid sequences identity value among exo-inulinases was detected for the enzymes from *A. awamori* and *A. ficuum* (90.88%), the smallest is between the enzyme from *A. niger* with enzymes from *B. licheniformis* and *G. stearothermophilus* (28.29%). The highest identity value for endo-inulinases is detected between two forms of endo-inulinase from *A. niger* (ABB59681.1 and EHA19510.1) and amounts to 97.87%, which is also the highest indicator for all enzymes presented in the work, the smallest identity is between the enzymes from *A. fumigatus* and *K. marxianus* (27.89%). The smallest indicator of homology among all enzymes presented in the work was detected between exo-inulinase from *A. niger* and β -fructosidase from *T. maritima* and was equal to 20.45%. The data presented in the paper demonstrate a significant amino acid composition of carbohydrates, which indicates the wide possibilities of their use in various conditions of industrial hydrolysis of inulin.

Key words: *glycoside-hydrolases, homology, amino acid sequences.*

РАЗМЕР ПРИРОДНЫХ ЛИНЕЙНЫХ ПЕПТИДНЫХ СТРУКТУР

Замятнин А.А., Белозерская Т.А.

Институт биохимии им. А.Н. Баха

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ленинский просп., 33, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: aaz@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Размер линейных молекул пептидной природы может рассматриваться как число содержащихся в них аминокислотных остатков (p). Целью работы был анализ области существования и встречаемости различных природных пептидных структур с различной величиной p . В работе использовались данные базы SwissProt о более чем $5,6 \cdot 10^5$ первичных структурах, определенных полностью (sequence complete). Из них нами были удалены структуры, содержащие нестандартные аминокислотные остатки, а также идентичные копии аминокислотных последовательностей. В результате для анализа использовано 463450 различных последовательностей длиной 2 до 35213 аминокислотных остатков. Анализ показал, что у разных биологических доменов и царств число встречающихся пептидных структур на шкале p характеризуются разными областями существования, а формы профилей полученных кривых близки к ряду известных распределений. В то же время у них могут наблюдаться острые высокие пики, свидетельствующие о наличии большого количества специфических белков с одинаковой величиной p . Таким образом продемонстрировано существование множества разных первичных структур белков одинаковой длины, обладающих одинаковыми функциями. Рассмотрены возможные причины особенностей полученных распределений.

Ключевые слова: пептид, белок, аминокислотная последовательность, база данных UniProt.

ВВЕДЕНИЕ

В общем случае пептидами называются природные вещества, состоящие из субмолекулярных блоков (двадцати стандартных аминокислотных остатков) соединенных пептидной связью [1]. Очевидно, что минимальным линейным пептидом является химическая структура, в которой два аминокислотных остатка соединены одной пептидной связью (дипептид). Природные пептидные структуры, содержащие много аминокислотных остатков (полипептиды), обычно называются белками, и длинные молекулы такого типа могут состоять из десятков тысяч аминокислотных остатков. Таким образом, размер (длина) молекулы пептидной природы p может варьировать в широком диапазоне числа аминокислотных остатков.

Также велико разнообразие аминокислотных последовательностей. Это основано на широком спектре возможных комбинаций 20 стандартных аминокислотных остатков. С ростом длины пептидной структуры p число таких комбинаций N_p стремительно растет в соответствии с известной формулой

$$N_p = 20^p,$$

(где p – число аминокислотных остатков в молекуле). В случае дипептидов $p = 2$, $N_2 = 400$, трипептидов $p = 3$, $N_3 = 8000$, тетрапептидов $p = 4$, $N_4 = 160000$ и т.д., а в конце интервала $2 \leq p \leq 50$, характеризующего олигопептиды [2, 3], т.е. при $p = 50$, это значение достигает величины $N_{50} \sim 10^{34}$. Конечно, не все комбинации аминокислотных остатков могут существовать в природе, но все же разнообразие возможных первичных структур следует признать гигантским. В данной работе изучено распределение числа различных (уникальных) природных пептидных структур по длине, т.е. по числу аминокислотных остатков p .

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения информации о природных пептидных структурах наиболее часто используется база данных UniProt, в которой объединены данные о расшифрованных первичных структурах экспериментально изученных белков (SwissProt) [4] и базы TrEMBL [5] о первичных структурах, полученных в результате трансляции (Tr) нуклеотидных последовательностей на язык аминокислот. На момент исследования база UniProt содержала сведения о 159 022 877 аминокислотных последовательностях, полученных для представителей архей, прокариот и эукариот. Минимальное число аминокислотных остатков $p = 2$ в ней содержат три олигопептида разного происхождения, а максимальное ($p = 74\,488$) – один транслированный бактериальный полипептид. Несмотря на такой большой диапазон p , большинство аминокислотных последовательностей сосредоточено в интервале $2 \leq p \leq 1000$ (154 685 385, т.е. более 97%). Распределение в этом интервале представлено на рисунке 1а. Характерной особенностью распределения является несколько острых пиков, свидетельствующих о существенно большем числе пептидных структур с данным числом аминокислотных остатков p по сравнению с соседними (близкими) величинами p . Среди них особенно выделяется пик при $p = 219$. Рассмотрение 594 841 структур, соответствующих этому пику, показало, что 227 570 из них являются белком cytochrome с oxidase subunit 1.

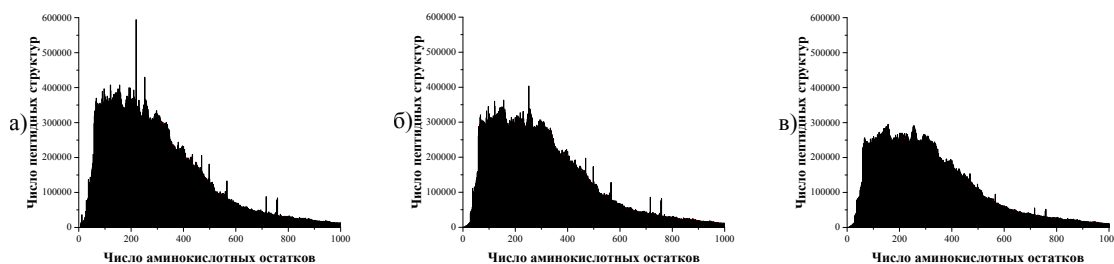


Рисунок 1. Зависимость числа аминокислотных последовательностей базы UniProt от числа аминокислотных остатков. (а) все последовательности; (б) последовательности, не являющиеся фрагментами; (в) последовательности, не являющиеся фрагментами, не содержащие нестандартные (О и U) или неидентифицированные (X) аминокислотные остатки, а также уникальные последовательности (без идентичных полных копий)

Данная величина примерно равна той части пика, которая возвышается над общей массой пептидных структур на рисунке 1а.

Однако данное распределение не дает представления об истинном числе встречаемости аминокислотных последовательностей в природе. Эти данные некорректны, поскольку в базе UniProt помимо полных последовательностей (complete) содержатся данные и о 15 495 873 неполных структурах (почти 10%), являющихся фрагментами (fragment). Распределение, представленное на рисунке 1б, характеризует массив 143 527 004 природных пептидных структур после исключения всех фрагментов из рассмотрения. В данном распределении также выявляется несколько пиков, но их величины и положение несколько отличаются от представленных на рисунке 1а.

Как выяснилось в процессе исследования, в базе UniProt имеются также последовательности, содержащие аминокислотные остатки, обозначенные буквами, не используемыми при описании стандартных остатков: О (оксипролина), U (α -аминомасляная кислоты), и X (неидентифицированного). Последовательности, в описании которых содержатся эти буквы, также были исключены из рассмотрения.

В базе UniProt имеется и большое число полностью идентичных аминокислотных последовательностей, полученных, как правило, для представителей разных, но таксономически близких живых организмов. Для того чтобы анализ был ограничен рассмотрением только разных структур, все дубликаты также были исключены из рассмотрения (рисунок 1в).

Описанные выше процедуры проводились на высокоскоростном сервере, позволяющем обрабатывать большие массивы информации. Возможность выделения полных последовательностей (complete) предусмотрена на сайте UniProt. В то же время экстракция «чистых» (содержащих только символы стандартных аминокислотных остатков) последовательностей и удаление дубликатов проводилось с помощью специально созданных программ. Специальная программа была сделана также для формирования распределений числа пептидных структур по числу аминокислотных остатков. Описанное ниже исследование проведено на базе SwissProt, представляющую часть базы UniProt и содержащую данные о выверенных (reviewed) аминокислотных последовательностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На момент исследования база SwissProt содержала сведения о 560 118 аминокислотных последовательностях, полученных для представителей архей, прокариот и эукариот. Минимальное число аминокислотных остатков $p = 2$ в ней содержали два олигопептида разного происхождения, а максимальное ($p = 35\,213$) – белок тайтин (titin) мыши [6]. Оказалось, что несмотря на такой большой диапазон p , большинство аминокислотных последовательностей сосредоточено в интервале $2 \leq p \leq 1000$ (542 302, т.е. около 97%). Распределение всех пептидных структур в этом интервале представлено на рисунке 2а. Характерной особенностью этого распределения является множество острых пиков, свидетельствующих о значительно большем числе пептидных структур с данным числом аминокислотных остатков p по сравнению с соседними величинами p . Среди них особенно выделяется два пика при $p = 156$ и 379. Рассмотрение структур, соответствующих этим пикам показало, что при $p = 156$, 2216 пептидных структур представляют собой большой набор самых разных белков. Однако в случае $p = 379$, из 1889 белков 1048 (две трети) являются митохондриальным цитохромом *b*. Данная величина примерно равна той части пика, которая возвышается над общей массой пептидных структур на рисунке 2а.

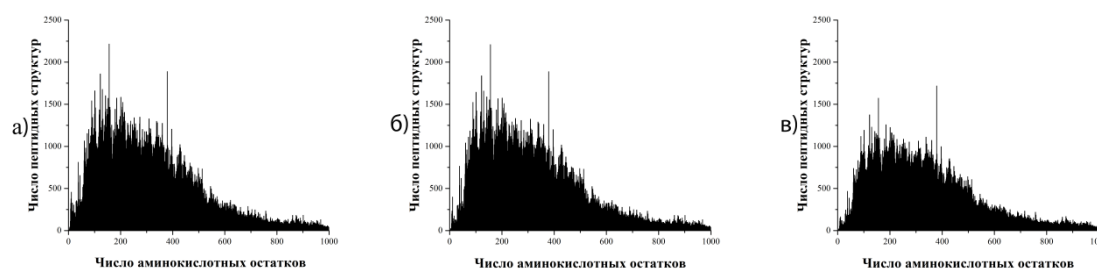


Рисунок 2. Зависимость числа аминокислотных последовательностей базы SwissProt от числа аминокислотных остатков. (а) все последовательности; (б) последовательности, не являющиеся фрагментами; (в) последовательности, не являющиеся фрагментами, не содержащие нестандартные (О и U) или неидентифицированные (X) аминокислотные остатки, а также уникальные последовательности (без идентичных полных копий)

Как и в случае UniProt, в данных базы SwissProt нами были удалены все неполные последовательности, являющиеся фрагментами (fragment). Распределение для полных последовательностей (complete) представлено на рисунке 2б. Этот рисунок мало отличается от рисунка 2а, поскольку фрагментарные последовательности базы SwissProt составляют лишь 1,6% (9167) от общего числа данных этой базы. Некоторое отличие заметно лишь в области олигопептидов, т.е. при малых значениях величины p .

Существенно измененное распределение получено нами после удаления последовательностей с нестандартными неидентифицированными аминокислотными остатками, а также после изъятия дубликатов (рисунок 2в). Отметим, что величина пика при $p = 156$ существенно уменьшилась, а при $p = 379$ осталась неизменной. Детальные данные о числе аминокислотных последовательностей, взятых для уже описанного и последующих анализов, собраны в таблице 1.

Из всей массы пептидных структур базы SwissProt нами были последовательно выделены и проанализированы уникальные последовательности таксономических групп различного уровня. На первом, самом высоком уровне были выбраны домены архей, прокариот и эукариот [7]. Несмотря на то, что число структур в этих доменах существенно различается (табл.1), общий характер распределения (рис. 3) у них одинаков. При этом подавляющая часть аминокислотных последовательностей, как и ранее, сосредоточена в интервале $2 \leq p \leq 1000$ (99,1% у архей, 98,7% у прокариот и 92,7% у эукариот). У архей (рис. 3а) заметных пиков практически не наблюдается, у прокариот (рис. 3б) таких пиков довольно много, а у эукариот (рис. 3в) большинство пиков не слишком велики за исключением одного при $p = 379$.

На следующем таксономическом уровне отдельно проанализированы уникальные аминокислотные последовательности царств: грибов, растений и животных (рис. 4). Общий характер полученных распределений свидетельствует о том, что у грибов пики практически не наблюдаются (рис. 4а), у растений их довольно много (рис. 4б), а в случае животных также выделяется целый ряд пиков, среди которых пик при $p = 379$ выделяется еще более ярко, чем в случае распределения для эукариот (рис. 3в).

Таблица 1. Данные о числе аминокислотных последовательностей в различных таксономических группах и биологических видах в базе SwissProt

Таксономические группы	латинское название группы, вида	все в SwissProt	без фрагментов	уникальные	$p_{\min}$	$p_{\max}$
Все		560118	550951	463450	2	35213
Эукариоты	<i>Eukaryota</i>	189697	182592	174063	2	35213
Животные	<i>Metazoa</i>	106843	102155	98070	2	35213
человек	<i>Homo sapiens</i>	20421	20421	20358	2	34350
Растения	<i>Viridiplantae</i>	39930	38014	35093	5	5400
резуховидка	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15856	15829	15768	5	5400
Грибы	<i>Fungi</i>	34084	33841	32431	3	11842
дрожжи	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7919	7912	7290	16	4910
Прокариоты	<i>Bacteria</i>	334009	332477	255373	7	10746
бактерии грам-	<i>Escherichia coli</i>	23138	23121	10153	7	3289
бактерии грам+	<i>Staphylococcus aureus</i>	10175	10164	3171	9	10746
Археи	<i>Archaea</i>	19554	19482	18452	25	9159
Вирусы	<i>Viruses</i>	16858	16400	15607	11	7182

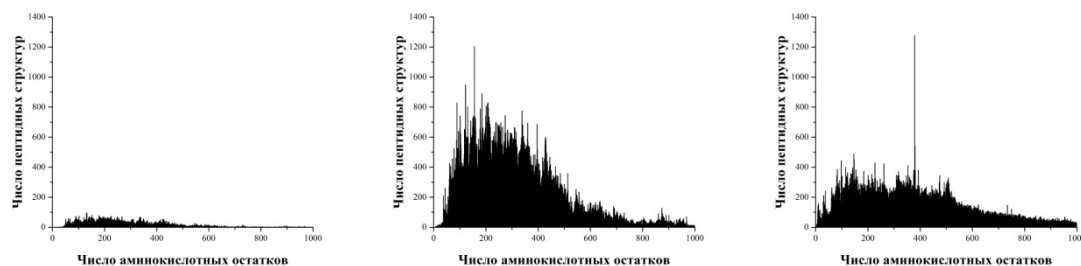


Рисунок 3. Распределение числа уникальных пептидных структур в базе SwissProt в различных биологических доменах. (а) археи, (б) прокариоты, (в) эукариоты

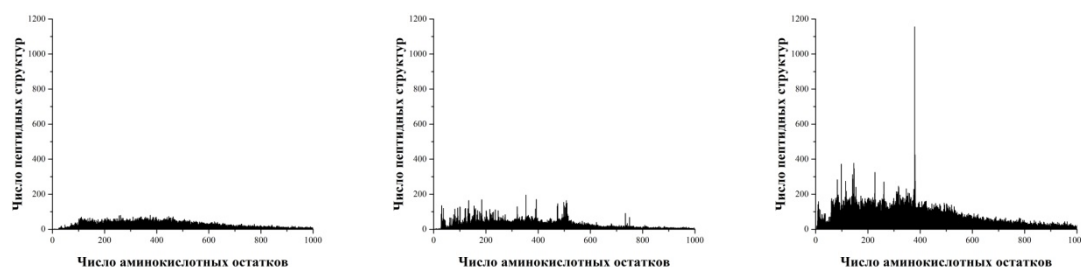


Рисунок 4. Распределение числа уникальных пептидных структур в базе SwissProt у различных эукариот. (а) грибы, (б) растения, (в) животные

Нами также были проанализированы уникальные аминокислотные последовательности отдельных представителей грибов, растений и животных (рис. 5). В случае дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) получено распределение с заметным пиком при $p = 440$ (рис. 5а). Оказалось, что большинство структур с этим числом аминокислотных остатков представляют собой различные белки, называемые transposon polyprotein. Довольно много не очень больших пиков проявляется у растения резуховидки (рис. 5б). В то же время у человека ярко выделяются два пика (рис. 5в). Один из них при $p = 117$ более чем на 50% составлен из различных иммуноглобулинов, а другой – при $p = 312$, также более чем наполовину, характеризует наличие большого числа белков обонятельных рецепторов.

Нами получены также распределения для совокупности пептидных структур грам-отрицательных (рис. 6а) и грам-положительных (рис. 6б) бактерий и для всех вирусов (рис. 7). Все эти распределения характеризуются большим числом заметных пиков. При этом многие пики в распределении вирусных структур отличаются большими величинами. Особенно выделяется пик при $p = 252$, в котором значительную часть занимает белок matrix protein у Influenza A virus, играющий ключевую роль в репликации вирусов, а пик при $p = 498$ почти полностью соответствует белку nucleoprotein (также у Influenza A virus), защищающим вирусную РНК от нуклеаз.

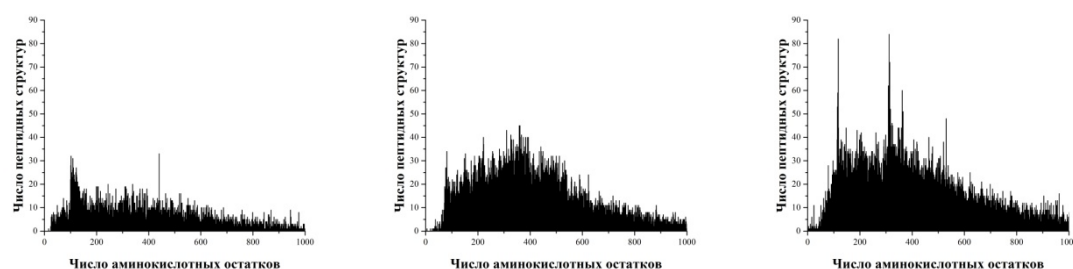


Рисунок 5. Распределение числа уникальных пептидных структур в базе SwissProt у отдельных представителей эукариот (грибов, растений, животных). (а) *Saccharomyces cerevisiae*, (б) *Arabidopsis thaliana*, (в) *Homo sapiens*

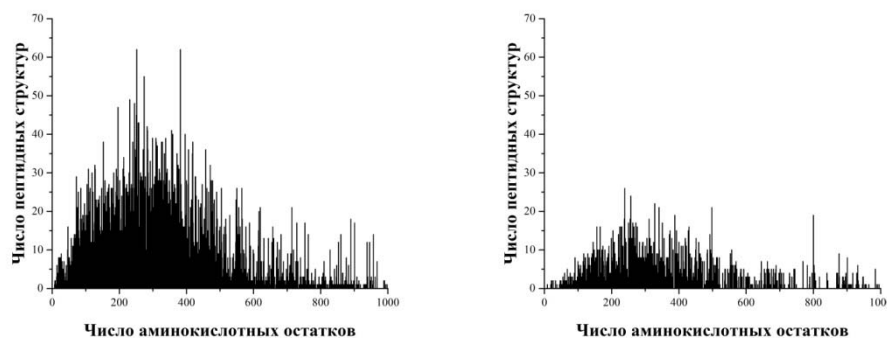


Рисунок 6. Распределение числа уникальных пептидных структур в базе SwissProt у представителей бактерий. (а) грам-отрицательные *Escherichia coli*, (б) грам-положительные *Staphylococcus aureus*

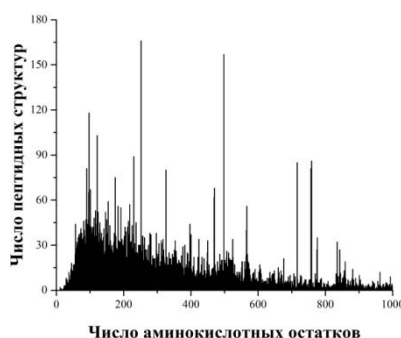


Рисунок 7. Распределение числа уникальных пептидных структур у вирусов в базе SwissProt

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Очевидно, что характер любого распределения нуждается в объяснении. Лучше всего объяснение могло бы быть сделано на основании аналитического выражения, выведенное из общих соображений о природе пептидных структур. Получение такого выражения пока что испытывает большие трудности, поскольку для этого необходим учет многих факторов: деталей генеза белков, особенности составляющих его элементов (физико-химическое разнообразие аминокислотных остатков), факторы эволюции и многое другое [8, 9].

Однако подбор математических выражений, позволяющий получать кривые, максимально близкие к реальным распределениям, проводился неоднократно. Так, для ряда отдельных организмов была использована функция логнормального распределения, которое вполне удовлетворительно описывало данные для 13 видов бактерий, 4 архей и 1 эукариота [10].

Этот же подход был осуществлен для описания распределений белков 1302 видов прокариот и 140 эукариот [11]. В указанном исследовании помимо логнормального распределения было использовано также распределение гамма типа. Совместное использование логнормального и гамма распределений [12] позволило авторам прийти к выводу о том, что средняя длина белков эукариот больше, чем у прокариот. Подобный вывод иллюстрируется и в данной нашей работе при рассмотрении рисунков 3б и 3в. Не менее успешно применялась также и лингвистическая модель Менсерат-Альтмана (Menzerath-Altmann) [13, 14]. С ее помощью было описаны данные 10 протеомов [15].

Однако во всех указанных работах основное внимание было уделено сглаживанию кривых распределений для подгонки к определенным математическим моделям. В то же время из приведенных нами результатов следует, что многочисленные пики практически у всех таксономических групп и отдельных видов живых организмов несут дополнительную информацию о пептидных структурах, формирующих эти распределения. Ярким примером является пик, прослеживаемый в распределении всех аминокислотных последовательностей базы SwissProt (рис. 2в), эукариот (рис. 3в) и животных (рис. 4в). Как уже было отмечено, этот пик представляет собой совокупность митохондриальных цитохромов *b*, имеющих одинаковую длину 379 аминокислотных остатков и обнаруженных только у животных. Дополнительный анализ распределения по длине цитохромов *b* животных (рис. 8) показал, что данные белки имеют преимущественную длину именно в 379 аминокислотных остатков (1028 белков). С несколько меньшим числом остатков насчитывается 99 белков, а с большим – 440.

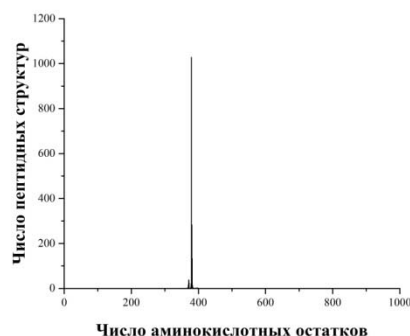


Рисунок 8. Распределение числа уникальных пептидных структур цитохрома *b* у эукариот в базе SwissProt

Столь большое число разных по аминокислотной последовательности, но с одинаковой величиной p , цитохромов *b* характерно именно для представителей животных. В SwissProt содержатся данные почти о 1700 разных аминокислотных последовательностях данного белка, полученных не только из животных. Они присутствуют и в бактериях, и растениях и в грибах. Однако все известные цитохромы *b* неживотного происхождения всегда содержат больше чем 379 аминокислотных остатков. Можно предположить, что минимальная величина этого трансмембранного белка в эволюционном процессе могла быть достигнута в результате отбора, приведшего к наиболее оптимальным размерам всех его 8 сайтов, пронизывающих мембрану [16].

Очевидно, что разнообразие функциональных свойств белков основано на разнообразии первичных структур их молекул. Можно найти много примеров тому, что малые одинаковые по длине пептидные структуры (олигопептиды) при одинаковом p обладают одинаковыми функциями [17]. В данной работе нами же, в частности, продемонстрировано, что существуют множества разных первичных структур белков одинаковой длины, обладающих одинаковыми функциями.

База UniProt постоянно пополняется. Однако уже сейчас большой объем информации, заключенный в ней, позволяет провести множество новых различных анализов связи размера, аминокислотных последовательностей и многих других физико-химических характеристик природных пептидных структур с многочисленными функциональными свойствами этих молекул.

Список литературы / References:

1. Sewald N., Jakubke H.-D. *Peptides: Chemistry and Biology*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002, 562 p.
2. Замятнин А.А. Особенности совокупности природных олигопептидов. *Нейрохимия*, 2016, т. 33, № 4, с. 265-275. DOI: 10.1134/S1819712416040176. [Zamyatnin A.A. Features of the totality of natural oligopeptides. *Neurochemistry*, 2016, vol. 33, no. 4, pp. 265-275. DOI: 10.1134 / S1819712416040176. (In Russ.)]
3. Zamyatnin A.A. Structural–functional diversity of the natural oligopeptides. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 2018, vol. 133, pp. 1-8. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.09.024.
4. Bairoch A., Boeckmann B. The SWISS-PROT protein sequence data bank. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, no 1, pp. 2247-2249. DOI: 10.1093/nar/19.suppl.2247.
5. Kneale G.G., Kennard O. The EMBL nucleotide sequence data library. *Biochem. Soc. Trans.*, 1984, vol. 12, no. 6, pp. 1011-1014. DOI: 10.1042/bst0121011.
6. Church D.M., Goodstadt L., Hillier L.W., Zody M.C., Goldstein S., She X., Bult C.J., Agarwala R., Cherry J.L., DiCuccio M., Hlavina W., Kapustin Y., Meric P., Maglott D., Birtle Z., Marques A.C., Graves T., Zhou S., Teague B., Potamouis K., Churas C., Place M., Herschleb J., Runnheim R., Forrest D., Amos-Landgraf J., Schwartz D.C., Cheng Z., Lindblad-Toh K., Eichler E.E., Ponting C.P.; Mouse Genome Sequencing Consortium. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol.*, 2009, vol. 7, no. 5, p. e1000112. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000112.
7. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, no. 12, pp. 4576-4579. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4576.
8. Замятнин А.А. Биофизические проблемы олигопептидной регуляции. *Биофизика*, 2003, т. 48, № 6, с. 1030-1039. [Zamyatnin A.A. Biophysical problems of oligopeptide regulation. *Biophysics*, 2003, vol. 48, no. 6, pp. 1030-1039. (In Russ.)]
9. Замятнин А.А. Биохимические проблемы олигопептидной регуляции. *Биохимия*, 2004, т. 69, № 11, с. 1565-1573. DOI: 10.1007/s10541-005-0073-8. [Zamyatnin A.A. Biochemical problems of oligopeptide regulation. *Biochemistry*, 2004, vol. 69, no. 11, pp. 1565-1573. (In Russ.)]
10. Ramakumar S. Stochastic dynamics modeling of the protein sequence length distribution in genomes: implications for microbial evolution. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 1999, vol. 273, no. 3, pp. 476-485. DOI: 10.1016/S0378-4371(99)00370-2.

11. Tiessen A., Pérez-Rodríguez P, Delaye-Arredondo L.J. Mathematical modeling and comparison of protein size distribution in different plant, animal, fungal and microbial species reveals a negative correlation between protein size and protein number, thus providing insight into the evolution of proteomes. *BMC Research Notes*, 2012, vol. 5, no. 85. DOI: 10.1186/1756-0500-5-85.
12. Jhang G. Protein-length distributions for the three domains of life. *Trends in Genetics*, 2000, vol. 16, no. 3, pp. 107-109. DOI: 10.1016/S0168-9525(99)01922-8.
13. Menzerath P. *Architektur des deutschen Wortschatzes*. Bonn, 1954, 131 p.
14. Altmann G. Prolegomena to Menzerath's law. *Glottometrika*, 1980, vol. 2, pp. 1-10.
15. Eroglu S. Language-like behavior of protein length distribution in proteomes. *Complexity*, 2014, vol. 20, pp. 12-21. DOI: 10.1002/cplx.21498.
16. Esposti M.D., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T., Meyer A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, vol. 1143, no 3, pp. 243-271. DOI: 10.1016/0005-2728(93)90197-n.
17. Замятнин А.А. Физико-химические и функциональные характеристики полной системы природных олигопептидов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 1, с. 225-235. [Zamyatnin A.A. Physico-chemical and functional characteristics of a complete system of natural oligopeptides. *Modern trends in biological physics and chemistry*, 2018, vol. 3, no. 1, p. 225-235. (In Russ.)]

SIZE OF THE NATURAL LINEAR PEPTIDE STRUCTURES

Zamyatnin F.F., Belozerskaya T.A.

A.N. Bach Institute of Biochemistry,

Research Center of Biotechnology Russian Academy of Sciences

Leninsky prosp., 33, Moscow 119071, Russia; e-mail: aaz@inbi.ras.ru

Abstract. The size of linear peptide molecules is considered as a number of amino acid residues (p) contained in them. The aim of this work was to analyze the region of existence and occurrence of various natural peptide structures with different p -values. We used SwissProt database contained more than 560000 complete primary structures. We have removed structures containing non-standard amino acid residues, as well as identical amino acid sequences. As a result, 463450 different sequences with a length of 2 to 35,213 amino acid residues were obtained for analysis. The analysis showed that the number of peptide structures on p -scale is characterized by different areas of existence in different biological domains and kingdoms, and the shapes of the profiles of the curves obtained are close to classical distributions. However, they can have sharp high peaks, indicating the presence of a large number of specific proteins with the same p -value. Possible reasons for the existence and features of such distributions are considered.

Key words: peptide, protein, amino acid sequence, UniProt database.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БРОМЕЛИНА В СВОБОДНОМ И ИММОБИЛИЗОВАННОМ СОСТОЯНИИ

Королева В.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Бромелин обладает широким спектром терапевтической эффективности: демонстрирует *in vitro* и *in vivo* противовоспалительную, антитромботическую и фибринолитическую виды активности. Энзим модулирует функции молекул адгезии в крови и эндотелиальных клетках, а также регулирует и активирует различные иммунные клетки и продукцию цитокинов. Фермент используется в качестве альтернативного или дополнительного лекарственного средства для глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных средств и иммуномодулирующих агентов. В представленной работе изучены физико-химические и кинетические свойства бромелина, свободного и иммобилизованного на матрице хитозана. Установлено, что диапазон температур для функционирования растворимого и сорбированного бромелина находится в пределах от 50 до 70°C; оптимальное значение pH для функционирования нативного и иммобилизованного фермента составляет 7,5; максимальные значения скорости ферментативного катализа для свободного и иммобилизованного препарата наблюдаются при концентрации азоказеина 0,4 мМ; максимальная скорость реакции для бромелина, иммобилизованного на среднемoleкулярном хитозане, снижается в 2,2 раза, а для сорбированного на высокомолекулярном хитозане – в 1,7 раза. Иммобилизация бромелина на матрице хитозана не приводит к сдвигу температурного оптимума, но увеличивает термостабильность фермента.

Ключевые слова: бромелин, иммобилизация, физико-химические свойства ферментов, хитозан.

Бромелайн или бромелин получают путем экстракции из ананаса (плоды и стебли). Препараты бромелина из плодов (КФ 3.4.22.33) отличаются от образцов бромелина из стеблей (КФ 3.4.22.32), они содержат различные ферментные композиции, такие как тиол-эндонептидазы и другие, еще не полностью охарактеризованные компоненты, такие как фосфатазы, глюкозидазы, пероксидазы, целлюлазы, гликопротеины и углеводы [1]. Бромелайн содержит сложную смесь протеазных и нестеаровых компонентов. Бромелин из стеблей содержит ряд цистеиновых протеиназ. Бромелин из плодов – гликопротеиновая протеиназа, присутствующая в ананасовом соке, которая гидролизует внутренние полипептидные связи широкого спектра белков [2, 3].

Для природного бромелаина ферментативная активность детектируется в пределах pH 5,5-8,0 [4-6]. Надзира К.З. и сотрудники сообщили, что бромелаиновая активность стабильна при pH 3,0-6,5 [3]. Амид А. и сотрудники отметили, что очищенный рекомбинантный бромелайн обладает оптимальной активностью при pH 4,6 и 45°C. Корзо С.А. и его коллеги заявили, что мало исследований было выполнено для определения оптимальной температуры для бромелиновой активности, но работы показали, что оптимальная температура находится между 30 и 60 °C и зависит от pH среды [3, 7].

Бромелайн способен гидролизировать сложные эфиры и амиды, такие как этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина и N-бензоил-L-аргинин амид. Хотя реакция не является специфичной, бромелин расщепляет гликоль, анаил и лейцильные связи. Препарат готовят из охлажденного ананасового сока путем центрифугирования, ультрафильтрации и лиофилизации. Этот процесс дает желтоватый порошок, активность фермента в котором определяется с помощью различных субстратов, таких как казеин, желатин или хромогенные трипептиды [8, 9]. При температуре 21 °C протеолитическая активность растворенного бромелина быстро снижается благодаря автолизу. Бромелин в концентрированных формах (более 50 мг/мл) – это стабильный препарат в течение недели при комнатной температуре с минимальной инактивацией [7].

Бромелин обладает широким спектром терапевтической эффективности: демонстрирует *in vitro* и *in vivo* противовоспалительную, антитромботическую и фибринолитическую виды активности. Энзим модулирует функции молекул адгезии в крови и эндотелиальных клетках, а также регулирует и активирует различные иммунные клетки и продукцию цитокинов. Фермент используется в качестве альтернативного или дополнительного лекарственного средства для глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных средств и иммуномодулирующих агентов. Его низкая токсичность делает энзим подходящим инструментом для борьбы с хроническими воспалительными заболеваниями [7].

Исследования в области получения высокостабильных гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов и клеток приобретают все большую актуальность. Общеизвестно, что при промышленном масштабировании каталитических процессов гетерогенный режим их проведения является экономически более выгодным по сравнению с гомогенными технологиями, так как при этом значительно упрощается и удешевляется весь производственный цикл. Очевидно, что носители для гетерогенных биокатализаторов должны быть доступными, обладать хорошими эксплуатационными свойствами и высокой адсорбционной емкостью по отношению к каталитически активному компоненту [9].

Хитозан и его производные обладают превосходными свойствами в качестве носителей для различных ферментов, которые могут быть применены в области медицины. В настоящее время доставка лекарств с помощью хитозана является актуальной проблемой благодаря различным характеристикам биополимера: химической модификации, биodeградации, воздействию на различные ткани и органы тела, мукоадгезии, ассоциации хитозана с неорганическими соединениями.

Хитозан является биосовместимым и не вызывает побочных реакций при контакте с клетками человека. Олигомеры хитозана могут активировать макрофаги и стимулировать синтез гиалуроновой кислоты. Хитозан обеспечивает строительные блоки для реконструкции компонентов внеклеточного матрикса. С другой стороны, хитозан «распознает» опухолевые клетки, и, следовательно, он может обеспечить адресную доставку лекарств к мишени [10].

Хитозан безопасен для организма человека, поэтому медицинские и фармацевтические препараты на его основе могут быть разработаны совместными усилиями специалистов в различных областях [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран бромелин фирмы «Sigma». Носителями для иммобилизации биокатализатора являлись кислоторастворимые высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа, степень деацетилирования – 94,85%) и средномолекулярный ($M_r = 200$ кДа, СД = 82%) хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс».

Для адсорбционной иммобилизации бромелина на высокомолекулярном и средномолекулярном хитозанах использовали 0,05 М трис-глициновый буфер со значениями pH 8,5 и 9,0 соответственно [12]. Концентрацию белка в системе энзим-носитель определяли методом Лоури. Каталитическую активность ферментов измеряли спектрофотометрически по количеству окрашенного продукта реакции в результате расщепления азоказеина фирмы «Sigma» [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Важными характеристиками энзимов, определяющими их каталитическую активность, являются оптимальные диапазоны температуры, pH и концентрации субстрата.

Ферментативная активность нативного и иммобилизованного на кислоторастворимом хитозане бромелина в зависимости от температуры представлена на рисунке 1. В ходе наших экспериментов было установлено, что для растворимого бромелина диапазон рабочих температур находится между 50 и 70°C, а для иммобилизованного на кислоторастворимом хитозане – от 40 до 70 °C. Однако при 80 °C свободный энзим был термически инактивирован на 76%, в то время как сорбированный на средномолекулярном хитозане фермент сохраняет порядка 69% активности от максимального значения, а иммобилизованный на высокомолекулярном – 79%. Таким образом, иммобилизация бромелина на матрице хитозана не приводит к сдвигу температурного оптимума, но увеличивает термостабильность фермента. Можно сделать предположение о том, что матрица хитозана предотвращает преждевременную денатурацию белка.

Результаты наших исследований каталитической активности ферментных препаратов от кислотности среды показали, что максимумы активности нативного и сорбированного на средномолекулярном и высокомолекулярном хитозанах бромелина наблюдаются при значении pH, равном 7,5. При pH 9,0 растворимый бромелин полностью инактивирован, в то время как иммобилизованный на средномолекулярном и высокомолекулярном хитозанах энзим активен на 53 и 63% соответственно (рис. 2).

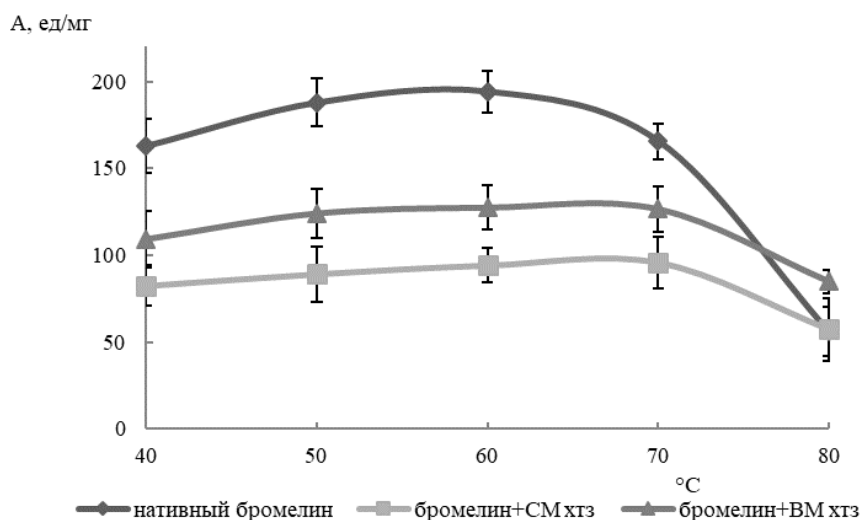


Рисунок 1. Зависимость каталитической активности свободного и иммобилизованного на хитозане бромелина от температуры инкубации

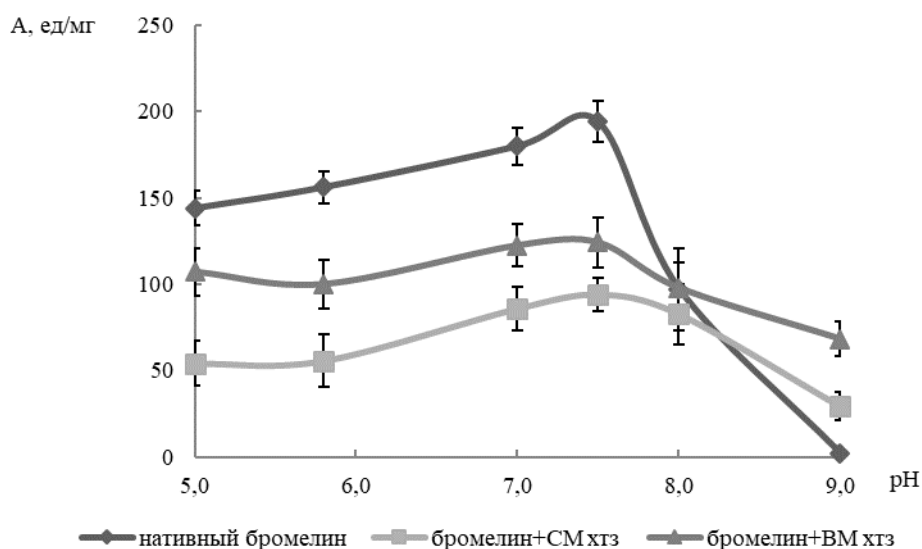


Рисунок 2. Зависимость каталитической активности свободного и иммобилизованного на хитозане бромелина от pH среды

Исследования по определению оптимальной концентрации субстрата проводились нами в диапазоне концентраций азоказеина от 0,0001 до 0,1 мМ. Результаты зависимости ферментативной активности свободного и сорбированного на матрице хитозана бромелина представлены на рис. 3. Максимальные значения скорости ферментативной реакции для нативного и иммобилизованных на матрице двух видов хитозана препаратов наблюдаются при концентрации субстрата, равной 0,04 мМ, при дальнейшем увеличении концентрации субстрата до 0,1 мМ не происходит статистически достоверных изменений в скорости ферментативного катализа.

Главной характеристикой энзима является степень его сродства к субстрату. Иммобилизация биокатализатора на нерастворимых носителях, как правило, способствует изменению кинетических параметров ферментативного катализа. Основываясь на результатах предыдущих экспериментов, нами были определены значения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции гидролиза азоказеина свободным и иммобилизованным бромелином, которые представлены в таблице 1. Иммобилизация бромелина на нерастворимом носителе привела к снижению значений $V_{\max}$ и увеличению степени сродства фермента к субстрату (уменьшение величины K_m).

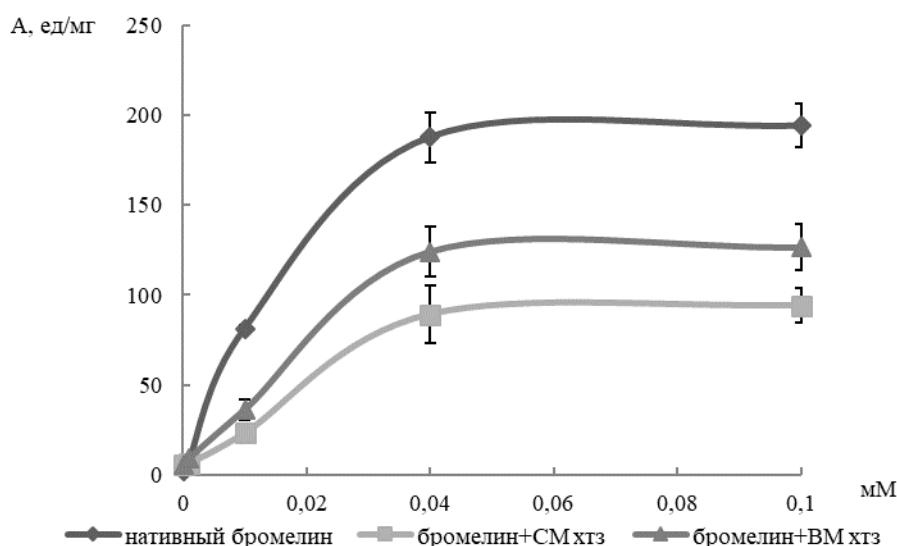


Рисунок 3. Зависимости каталитической активности свободного и иммобилизованного на хитозане бромелина от концентрации субстрата

Таблица 1. Кинетические свойства нативного и иммобилизованного бромелина

Препарат	$V_{\max}$, мкМ/(мг·мин)	K_m , мМ
Нативный бромелин	238 ± 2	$0,019 \pm 0,003$
Бромелин + среднемолекулярный хитозан	110 ± 1	$0,010 \pm 0,002$
Бромелин + высокомолекулярный хитозан	144 ± 2	$0,010 \pm 0,001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы физико-химические и кинетические свойства нативного и иммобилизованного на матрице хитозана бромелина. Установлены оптимальные условия каталитической реакции растворимого и иммобилизованного на матрице хитозана бромелина. Полученные результаты вносят определенный вклад в совокупность знаний для выбора оптимальных условий применения иммобилизованных образцов бромелина в биотехнологических целях.

Список литературы / References:

1. Amini A., Masoumi-Moghaddam S., Morris D.L. *Utility of bromelain and N-acetylcysteine in treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal mucin-producing malignancies*. Springer, 2016, 246 p.
2. Homaei A.A., Sajedi R.H., Sariri R., Seyfzadeh S., Stevanato R. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids*, 2010, vol. 38, pp. 937-942. DOI: 10.1007/s00726-009-0302-3
3. Martins B.C., Rescolino R., Coelho D.F., Espindola F.S., Zanchetta B., Tambourgi E.B., Silveira E. Studies of stability and characterization this enzyme bromelain in pineapple (*Ananas comosus*). *BMC Proceedings*, 2014, vol. 8, p. 137. DOI: 10.1186/1753-6561-8-S4-P137
4. Глик Б., Пастернак Д. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение*. М.: Мир, 2002, 589 с. [Glik B., Pasternak D. *Molecular biotechnology. Principles and application*. M.: Mir, 2002, 589 p. (In Russ.)]
5. Келети Т. *Основы ферментативной кинетики*. М.: Мир, 1990, 350 с. [Keleti T. *Basics of enzymatic kinetics*. M.: Mir, 1990, 350 p. (In Russ.)]
6. Ленинджер А. *Основы биохимии. Т. 1*. М.: Мир, 1985, 365 с. [Lenindzher A. *Basics of biochemistry. Vol. 1*. M.: Mir, 1985, 365 p. (In Russ.)]
7. Husain S.S., Lowe G. The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues, and the buried cysteine residue in ficin. *Biochem. J*, 1970, vol. 117, pp. 333-340.
8. Devaraj K.B., Kumar P.R., Prakash V. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 11417-11423. DOI: 10.1021/jf802205a.
9. Скрыбин К.Г. *Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение*. М.: Наука, 2002, 368 с. [Skryabin K.G. *Chitin and chitosan. Preparation, properties and application*. M.: Nauka, 2002, 368 p. (In Russ.)]
10. Magnin D., Lefebvre J., Chornet E., Dumitriu S. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydrate Polymers*, 2004, vol. 55, pp. 437-453. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.11.013.
11. Kumar M.N.V.R., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A.J., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.*, 2004, vol. 104, pp. 6017-6084. DOI: 10.4236/ajac.2014.510077.
12. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Королева В.А. *Способ получения гетерогенного препарата различной дисперсности на основе бромелайна и хитозана*. Патент на изобретение № 2677232, 2019. [Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Koroleva V.A. *The method of obtaining a heterogeneous preparation of different dispersion based on bromelain and chitosan*. Patent for invention № 2677232, 2019. (In Russ.)]
13. Королева В.А., Холявка М.Г., Сазыкина С.М., Ольшаникова С.С., Артюхов В.Г. Исследование сорбционной емкости кислоторастворимых хитозанов по отношению к бычьему сывороточному альбумину. *Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация»*, 2015, № 4, с. 85-89. [Koroleva V.A., Holyavka M.G., Sazykina S.M., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G. Study of the sorption capacity of acid-soluble chitosans toward bovine serum albumin. *Vestnik VGU. Seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya»*, 2015, no. 4, pp. 85-89. (In Russ.)]

INVESTIGATION OF THE PHYSICO-CHEMICAL AND KINETIC PROPERTIES OF BROMELAIN IN THE FREE AND IMMOBILIZED STATE

Koroleva V.A., Holyavka M.G., Artukhov V.G.

Voronezh state university

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Abstract. Bromelain has a wide range of therapeutic efficacy: it demonstrates *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory, antithrombotic and fibrinolytic activities. The enzyme modulates the functions of adhesion molecules in the blood and endothelial cells, as well as regulates and activates various immune cells and cytokine production. The enzyme is used as an alternative or additional preparation for glucocorticoids, non-steroidal antirheumatic preparations and immunomodulating agents. In the present work, the physico-chemical and kinetic properties of bromelain in free and immobilized on the chitosan matrix states were studied. It has been established that the temperature range for the functioning of soluble and sorbed bromelain ranges from 50 to 70°C; the optimum pH for the functioning of the native and immobilized enzyme is 7.5; the maximum rate of enzymatic catalysis of free and immobilized preparations is observed at azocasein concentrations of 0.4 mM; the maximum reaction rate for bromelain immobilized on medium molecular chitosan decreases 2.2 times, and for enzyme sorbed on high molecular chitosan it decreases 1.7 times. Immobilization of bromelain on the chitosan matrix does not lead to a shift in the temperature optimum, but increases the thermal stability of the enzyme.

Key words: bromelain, immobilization, physico-chemical properties of enzymes, chitosan.

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПОКРЫТИЯ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ НА КОЛЛОИДНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ В РАСТВОРАХ ТРАНСФЕРРИНА

Воротнов А.Д.¹, Цареградская А.И.¹, Лианг Л.³, Юдинцев А.В.¹, Костюк А.Б.¹, Звягин А.В.¹⁻³

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: a.r.t.e.s@mail.ru

² Сеченовский университет
ул. Трубецкая, 8, г. Москва, 119991, РФ

³ Университет Маккуори
Балаклава-роуд, 2109, г. Сидней, Австралия

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Коллоидная стабильность наночастиц (НЧ) играет ключевую роль в их успешном применении в различных биомедицинских приложениях. Насколько бы хорошо не были изучены их свойства в идеализированных условиях, все может кардинально измениться при взаимодействии с биологическими объектами. В живом организме НЧ в первую очередь встречают белки, которые формируют на их поверхности так называемую белковую корону. Хотя в большинстве случаев НЧ взаимодействуют со множеством белков одновременно, по-прежнему актуальными являются исследования взаимодействия НЧ с отдельными белками, а также последствий, к которым они приводят. В данной работе было исследовано влияние поверхностного покрытия наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ) на коллоидную стабильность в растворах трансферрина (Тф). Показано, что в случае положительно заряженных НАФ-ПЭИ, Тф играет роль коагулянта и приводит к выпадению НЧ в осадок. В то время как коллоидная стабильность отрицательно заряженных НАФ-ПАК зависит от числа молекул Тф, приходящихся на одну НЧ. Так при избытке Тф в растворе наблюдается образование монослоя белка на поверхности НАФ-ПАК, который обеспечивает их коллоидную стабильность и может быть использован при разработке тераностических агентов, способных преодолеть гемато-энцефалический барьер.

Ключевые слова: белковая корона, антистоксовые нанопосфосы, трансферрин, флуоресцентная корреляционная спектроскопия, агрегация.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие неуклонно растет число публикации по «белковой короне» - слое белка, адсорбированного на поверхности наночастиц (НЧ) различной природы [1], что свидетельствует о высоком интересе исследователей к данной теме. Однако, данная тематика практически не охватывает новый класс неорганических фотолюминесцентных НЧ – наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ). Благодаря своим уникальным фотофизическим свойствам [2], низкой цитотоксичности [3, 4], возможности изменения характеристик на этапе синтеза и модификации поверхности, они могут использоваться в различных областях биомедицины: оптической визуализации [5], тераностике [6], фотодинамической терапии [7], доставке лекарств [8] и др.

В общем случае, непосредственно после введения в биологическую среду, происходит активное взаимодействие НЧ с окружающими белками с последующим формированием белковой короны. При этом свойства комплексов НЧ-белок зависят от множества параметров, таких как: размер, форма, шероховатость и химические свойства поверхности НЧ, а также от концентраций и типов белков, находящихся в среде. В дальнейшем, адсорбированный белковый слой играет ключевую роль в клеточной интернализации, биораспределении, выведении из организма и токсичности. Так, образование белковой короны на поверхности тераностических комплексов на платформе НЧ способно изменить заранее заданные свойства последних и повлиять на эффективность направленной доставки данных комплексов к целевым клеткам [9]. Именно поэтому, понимание процессов формирования белковой короны на поверхности НАФ является ключевым для эффективного и безопасного применения данного типа частиц.

Коллоидная стабильность НАФ является одним из наиболее важных свойств, которые могут изменяться при взаимодействии с белками. На данный момент влияние различных белков на стабильность НЧ остается недостаточно изученным. В то время как одни исследователи наблюдают коллоидную стабильность НЧ при образовании белковой короны [10-12], другие сообщают о кластеризации или агрегации частиц [13-15].

Для исследования образования белковой короны на поверхности НЧ применяется широкий спектр методов [16], большинство из которых нуждается в очистке образца от слабо связанных белков (называемых «протеиновое облако») перед измерением, что вносит искажения в получаемые результаты. Указанного недостатка лишен метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) [17], который позволяет количественно анализировать адсорбцию белков непосредственно в биологической среде, содержащей, как

адсорбированные, так и слабосвязанные с НЧ белки. ФКС является одним из методов *in situ*, позволяющим измерять с точностью до субнанометра увеличение гидродинамического радиуса (R_h) НЧ при формировании белковой короны.

В данной работе при помощи ФКС было проведено исследование влияния поверхностного покрытия НАФ на их коллоидную стабильность при инкубации с растворами трансферрина (Тф). Выбор Тф был обусловлен тем, что он является одним из самых распространенных гликопротеинов крови и отвечает за транспорт железа в кровеносной системе. Кроме того, Тф интернализуется путем специфического взаимодействия со своим родственным рецептором на клеточной мембране и может быть использован в качестве направляющего лиганда для модификации терапевтических НЧ [18, 19] или контрастирующих веществ [20].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и поверхностная модификация НАФ. В работе были использованы НАФ, представляющие собой гексагональные нанокристаллы NaYF_4 , легированные 20 ат. % Yb^{3+} и 8 ат. % Tm^{3+} . Описание методики синтеза НАФ приведено в работе [21]. Для придания НАФ положительного и отрицательного поверхностного заряда они были покрыты полимерами: полиэтиленгликолем (ПЭГ) и полиакриловой кислотой (ПАК), соответственно. Для этого, лиганды олеиновой кислоты на поверхности НАФ были удалены при помощи NOBF_4 [22]. 5 мл раствора НАФ в циклогексане (5 мг/мл) смешивали с 5 мл N,N-диметилформамидного (ДМФА) раствора NOBF_4 (0,01 М), которые затем перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После этого, НАФ центрифугировали, повторно диспергировали в ДМФА и флокулировали со смесью толуола и циклогексана (1/1). Далее, НАФ были дважды промыты в этаноле и диспергированы в 5 мл этанола. Так же, 100 мг ПЭГ были разведены в 5 мл этанола и смешаны с ранее полученным раствором НАФ в этаноле при интенсивном перемешивании в течение 24 ч при комнатной температуре. Наконец, несвязанные молекулы ПЭГ были удалены путем центрифугирования, после чего НАФ-ПЭГ промывались в этаноле и дважды в дистиллированной воде. НАФ-ПАК были синтезированы по той же методике, за исключением добавления 25 мл раствора ПАК в этаноле (4 мг/мл) вместо ПЭГ. Реакцию замещения лигандов ПАК проводили при 80 °С при перемешивании в течение 3 ч. Конечный продукт НАФ-ПЭГ и НАФ-ПАК диспергировали в воде (1 мг/мл) для хранения.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). ПЭМ изображения НАФ после синтеза, а также после покрытия их поверхности ПАК и ПЭГ, были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа Philips CM10 при ускоряющем напряжении 100 кВ. Капли объемом 5 мкл растворов НАФ в циклогексане, НАФ-ПЭГ и НАФ-ПАК в воде были нанесены на медные решетки, покрытые углеродом, после чего высушены при комнатной температуре.

Динамическое рассеяние света (ДРС) и лазерная доплеровская велосиметрия (ЛДВ). Измерения R_h и дзета-потенциала НЧ были выполнены на системе Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания), оснащенной 633-нм He-Ne лазером. Измерения размеров НАФ были проведены методом ДРС в полистирольных кюветах (Sarstedt AG & Co. KG, Германия). Размеры анализировались на основе данных о распределении размеров НАФ по числу частиц. Измерения дзета-потенциала были выполнены методом ЛДВ в одноразовых U-образных капиллярных кюветах DTS1070 (Malvern Panalytical, Великобритания).

Приготовление растворов Тф. Исходный раствор Тф был получен путем смешивания 20 мг лиофилизированного порошка Тф из человеческой плазмы крови (кат. № 90190, Sigma-Aldrich) с 0,5 мл физиологического раствора (ФР) (рН 7,0-7,5, кат. № P010п, ПанЭко). Далее раствор Тф пропусклся через 0,22 мкм мембранный фильтр для удаления агрегатов. Концентрация Тф в получившемся растворе была определена методом ВСА. Все последующие разведения растворов Тф до концентраций 300, 30, 3, 0,3, 0,03 и 0,003 мкМ выполнялись с помощью добавления ФР.

Инкубация НАФ-ПАК и НАФ-ПЭГ с Тф. Перед инкубацией с растворами Тф водные растворы НАФ-ПЭГ и НАФ-ПАК подвергались очистке от агрегатов. Для этого пробирки с водными растворами НАФ озвучивали в течение 30 минут в ультразвуковой ванне G112SP1T (Avanti, США), а затем центрифугировали при 0,5 g в течение 20 минут на центрифуге 5418 R (Eppendorf, Германия). После чего из пробирок отбирался супернатант НАФ, который в дальнейшем использовался для проведения инкубации с растворами Тф.

Водные растворы НАФ-ПЭГ и НАФ-ПАК смешивались с растворами Тф в равных объемах таким образом, чтобы концентрация белка в конечных растворах составляла 150, 15, 1,5, 0,15, 0,015 и 0,0015 мкМ, а концентрация НАФ - 0,4 мкм⁻³ для всех растворов. Кроме того, для контроля, водные растворы НАФ-ПАК и НАФ-ПЭГ были смешаны с деионизованной водой и ФР. Инкубация образцов производилась в течение 10 минут при температуре 21 °С.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС). Эксперименты ФКС проводились на инвертированном лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Германия), оснащенный системой счета одиночных фотонов с временной корреляцией (TCSPC) (Simple-Tau 152, Becker & Hickl GmbH, Германия). НАФ возбуждались с помощью Ti:Sa фемтосекундного лазера Chameleon Vision II (Coherent, США) на длине волны 975 нм, путем фокусировки излучения внутри растворов с помощью водно-иммерсионного объектива (C-Apochromat 63x / 1,2w Corr, Carl Zeiss, Германия). Фотолуминесценция (ФЛ) НАФ собиралась тем же объективом, проходила через дихроичное зеркало (ZT1064rdc-sp, Chroma, США) и краевой коротковолновый фильтр (FF01-890/SP, Semrock, США) на недесканирующий порт микроскопа. Затем

свет разделялся с помощью дихроичного зеркала (FF552-Di02, Semrock, США) и с помощью полосового фильтра (FF01-466/40, Semrock, США) выделялся диапазон 446–486 нм. После этого ФЛ НАФ регистрировалась с помощью точечного гибридного детектора HPM-100-40 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Фотоны были записаны с помощью карты SPC-150 (Becker & Hickl GmbH, Germany) в FIFO (first in, first out) режиме. Все измерения проводились в лаборатории при контролируемой температуре 21 °С, используя среднюю мощность возбуждения ~ 840 мВт на образце. Исследуемые образцы помещались в отдельные лунки 96 луночного планшета с прозрачным дном из покровного стекла толщиной 170 мкм (кат. № 0030741030, Eppendorf). Фокальная плоскость была установлена на глубине 240 мкм от поверхности покровного стекла внутри растворов, чтобы избежать засветки детектора ярким сигналом, исходящим от агрегатов НАФ осевших на дно лунки планшета за время инкубации (10 минут).

Определение наблюдаемого объема ($V_{\text{наб}}$) было выполнено путем получения 3D изображений ФЛ НАФ-ПЭИ, нанесенных на поверхность покровного стекла [23]. Возбуждение осуществлялось на длине волны 975 нм, ФЛ НАФ регистрировалась в диапазоне 446–486 нм.

3D изображения ФЛ НАФ представляют собой $V_{\text{наб}}$, который хорошо описывается трехмерной функцией Гаусса [24]:

$$G(x, y, z) = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2+y^2)}{r_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{z_0^2}\right), \quad (1)$$

где I_0 – максимальное значение интенсивности ФЛ, r_0 и z_0 соответствуют латеральному радиусу и половине высоты, на которых значение интенсивности ФЛ составляет $1/e^2$ от I_0 . При этом $V_{\text{наб}} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$.

Путем аппроксимации ортогональных проекций XY и XZ профилей интенсивности ФЛ НАФ были получены значения r_0 и z_0 , с помощью которых был определен $V_{\text{наб}}$.

Анализ данных ФКС. Автокорреляционные кривые рассчитывались с помощью программного обеспечения SPCM (Becker & Hickl GmbH, Германия). Для каждого образца были получены 5 автокорреляционных кривых, которые затем аппроксимировались автокорреляционной функцией для случая 3D диффузии частиц одного типа:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{s^2 \tau_d}\right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (2)$$

где N – среднее число частиц в $V_{\text{наб}}$, τ_d – время диффузии частиц через $V_{\text{наб}}$, $s = \frac{z_0}{r_0}$.

Таким образом, были получены N и τ_d НАФ при фиксированном значении $s = 3,1$, которое было определено при калибровке $V_{\text{наб}}$. Используя связь τ_d с коэффициентом диффузии (D):

$$\tau_d = \frac{r_0^2}{4D}, \quad (3)$$

были рассчитаны R_h НАФ через соотношение Стокса-Эйнштейна:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (4)$$

где k – постоянная Больцмана, T – температура, η – коэффициент вязкости раствора при заданной температуре.

Изменения вязкости растворов при увеличении концентрации Тф были учтены с помощью линейного приближения вклада растворенного вещества в вязкость каждого из растворов через характеристическую вязкость Тф $[\eta] = 4,4 \text{ см}^3 \text{ г}^{-1}$ [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате синтеза НАФ были получены преимущественно сферические НЧ как видно на ПЭМ изображении (рис. 1А). Анализ ПЭМ изображений НАФ после синтеза показал, что распределение частиц монодисперсное, со средним диаметром $21,7 \pm 0,2$ нм. Кроме того, частицы распределены в поле зрения равномерно и ни что не указывает на их агрегацию. В случае НАФ-ПАК на ПЭМ изображении (рис. 1Б) наблюдается «скупенность» частиц, которая, как мы предполагаем, обусловлена их кластеризацией. Аналогичное поведение НАФ прослеживается и для случая модификации поверхности слоем ПЭИ, как видно из рисунка 1В. Поэтому для осаждения крупных агрегатов НАФ нами была проведена предварительная подготовка образцов, которая заключалась в озвучивании, центрифугировании и отборе супернатанта.

Измерение R_h методом ДРС показало, что средний радиус кластеров НАФ после обработки равен $23,8 \pm 1,2$ нм. Учитывая толщину полимерного покрытия НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ, которая составляет ~ 2 нм, как видно на вставках рисунков 1Б и 1В, можно заключить, что в результате предварительной подготовки в водных растворах остались фракции частиц, преимущественно состоящие из кластеров НАФ, содержащих от 2

до 5 частиц. Несмотря на это, полученные водные растворы НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ оставались коллоидно стабильными как минимум в течение месяца, согласно данным полученным методом ФКС. Вероятно, высокую коллоидную стабильность кластеров НАФ в водном растворе обеспечивали высокие положительные $56,5 \pm 1,1$ мВ и отрицательные $-33,1 \pm 0,4$ мВ значения дзета-потенциалов НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК, соответственно.

Однако, в ФР для обоих типов НАФ была выражена кластеризация частиц, которая заключалась в увеличении R_h и уменьшении N в наблюдаемом объеме (рисунок 2 и 3). Вероятно, склонность НАФ к агрегации в ФР вызвана полярностью молекул NaCl, находящихся в растворе, и поверхностным зарядом самих НЧ, что приводит к сильным электростатическим взаимодействиям между ними.

Нами также было проведено исследование влияния поверхностного покрытия НАФ на коллоидную стабильность частиц в растворах Тф с концентрациями от 1,5 нМ до 150 мкМ. Мы обнаружили, что инкубация НАФ-ПАК с растворами Тф не приводит к монотонному увеличению гидродинамического радиуса с выходом на насыщение при увеличении концентрации белка, как это было показано для FePt, частиц группой Nienhaus [11, 26]. Вместо этого, при инкубации НАФ-ПАК с растворами Тф (рис. 2) при концентрации белка 150 нМ наблюдается скачкообразное увеличение гидродинамического радиуса и уменьшение числа частиц в наблюдаемом объеме, что свидетельствует об образовании агрегатов частиц. В тоже время, при дальнейшем увеличении концентрации белка наблюдается стабилизация R_h и N . При концентрации Тф 150 мкМ на поверхности НЧ образуется монослой белка толщиной 5,3 нм, что хорошо согласуется с геометрическими размерами Тф ($4,2 \times 10 \times 7$ нм³) [11].

Полученные результаты хорошо описываются моделью, предложенной Cukalevski et al.[14]. Согласно данной модели можно выделить четыре режима адсорбции белка.

Первый режим реализуется при малых концентрациях белка. При этом адсорбированный на поверхности белок может служить «мостиком» между двумя частицами, связывая их друг с другом. В данном случае раствор будет состоять из небольших агрегатов и свободных частиц.

Во втором режиме, при дальнейшем увеличении концентрации происходит активное присоединение белка на большую часть поверхности НЧ. При этом, белок на поверхности одной частицы способен связаться с несколькими частицами. Как следствие данный процесс приводит к образованию крупных агрегатов. В нашем случае, данный режим достигается при концентрации Тф 150 нМ и сопровождается выпадением крупных агрегатов в осадок, которые можно наблюдать в проходящем свете на дне лунки планшета (рис. 2В, агрегаты отмечены белыми стрелками).

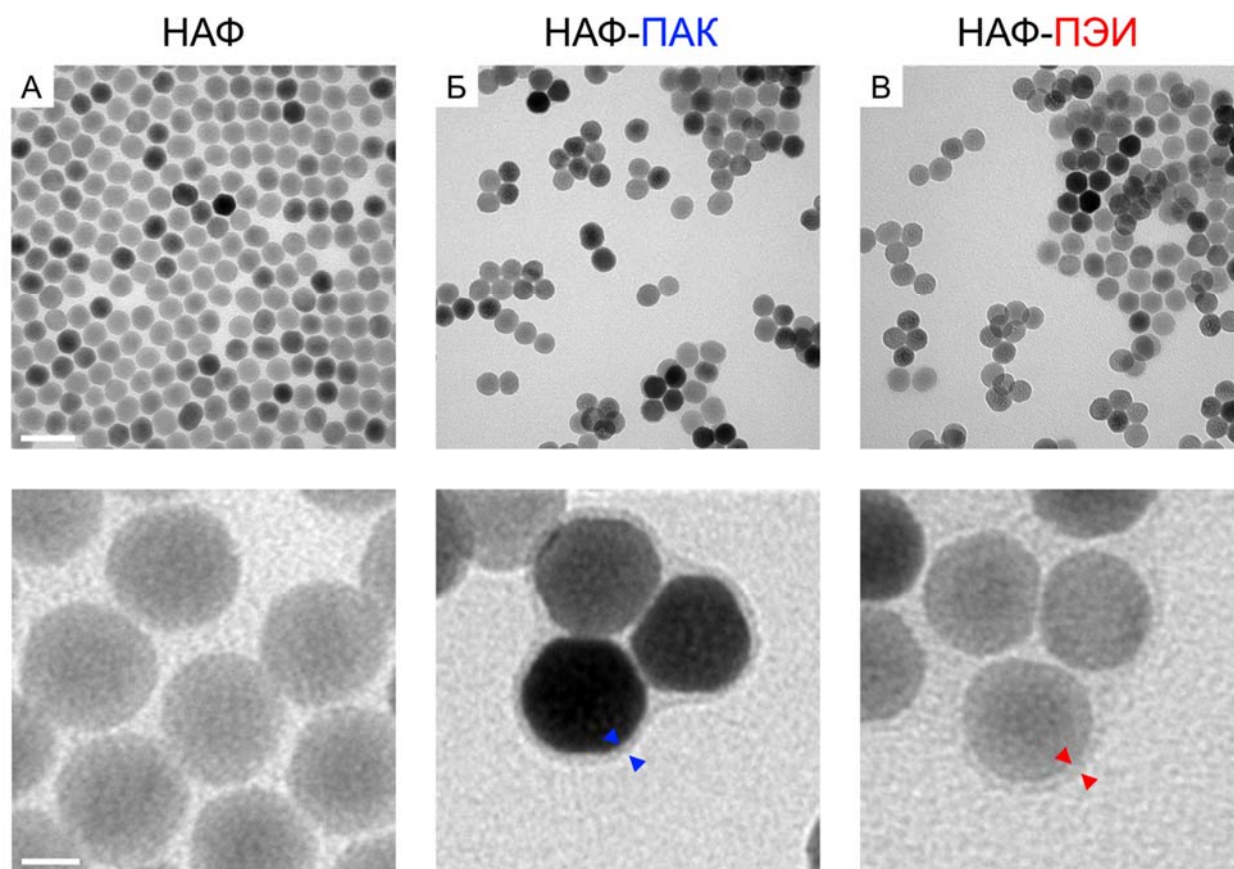


Рисунок 1. ПЭМ изображения НАФ после синтеза (А), а также после покрытия их поверхности ПАК (Б) и ПЭИ (В). Масштабный отрезок 50 нм. На вставках снизу приведены увеличенные ПЭМ изображения, отображающие толщины полимерных покрытий ПАК и ПЭИ, отмеченных синими и красными стрелками, соответственно. Масштабный отрезок 10 нм

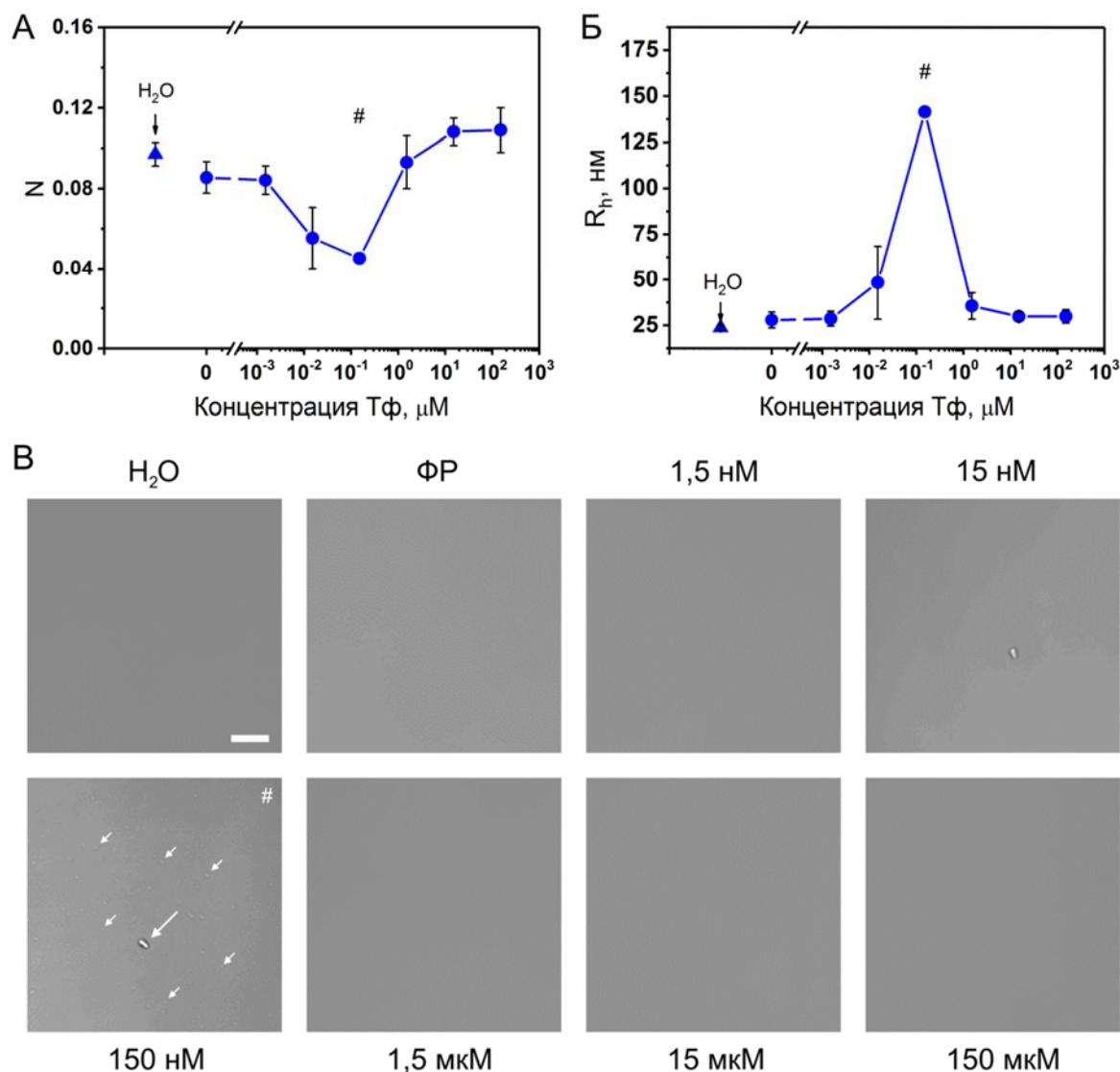


Рисунок 2. Инкубация в течение 10 минут НАФ-ПАК с Тф в различных концентрациях при 21 °С. Число частиц НАФ-ПАК в наблюдаемом объеме (А) и их гидродинамический радиус (Б) в зависимости от типа раствора и концентрации Тф. Решеткой (#) отмечена концентрация Тф, для которой наблюдалась значительная агрегация НАФ-ПАК, сопровождаемая большим разбросом значений R_h . Изображения дна лунок планшета в проходящем свете с растворами НАФ-ПАК в воде, ФР и растворах Тф при различных концентрациях (В). Решеткой (#) отмечено изображение, соответствующее концентрации Тф в растворе при которой наблюдалась наибольшая агрегация НАФ-ПАК. Белыми стрелками отмечена небольшая часть агрегатов, которые выпали в осадок на дно лунки планшета. Масштабный отрезок 5 мкм

В третьем режиме, при еще больших концентрациях, белок начинает покрывать значительную часть поверхности НЧ, что снижает вероятность связи двух частиц посредством белка и приводит к появлению небольших агрегатов.

В четвертом режиме в условиях большого избытка белка происходит быстрое покрытие НАФ слоем белка, который опосредует дальнейшее взаимодействие частиц. Аналогичное поведение наблюдалось в работе [15], где НЧ золота диаметром 20 нм инкубировали с различными белками: человеческим сывороточным альбумином, аполиipoproteином А1, фибриногеном и иммуноглобулином G.

При инкубации НАФ-ПЭИ с Тф наблюдается иной характер образования белковой короны (рис. 3). Как и в случае НАФ-ПАК на средних концентрациях Тф (150 нМ) наблюдается скачкообразное увеличение R_h и уменьшение N . Однако, при дальнейшем увеличении концентрации белка коллоидной стабильности НАФ-ПЭИ не наблюдается, а происходит выпадение крупных кластеров НАФ-ПЭИ в осадок, которые легко визуализируются на дне лунки планшета (рис. 3В). Предположительно это связано с разворачиванием структуры Тф после присоединения его к одной частице, с последующей возможностью связаться со второй частицей образуя кластер, увеличивающийся в размерах во всех направлениях по мере присоединения других молекул белка. При этом стабилизации НАФ-ПЭИ в растворах с высокими концентрациями Тф не происходит, а белок играет роль коагулянта.

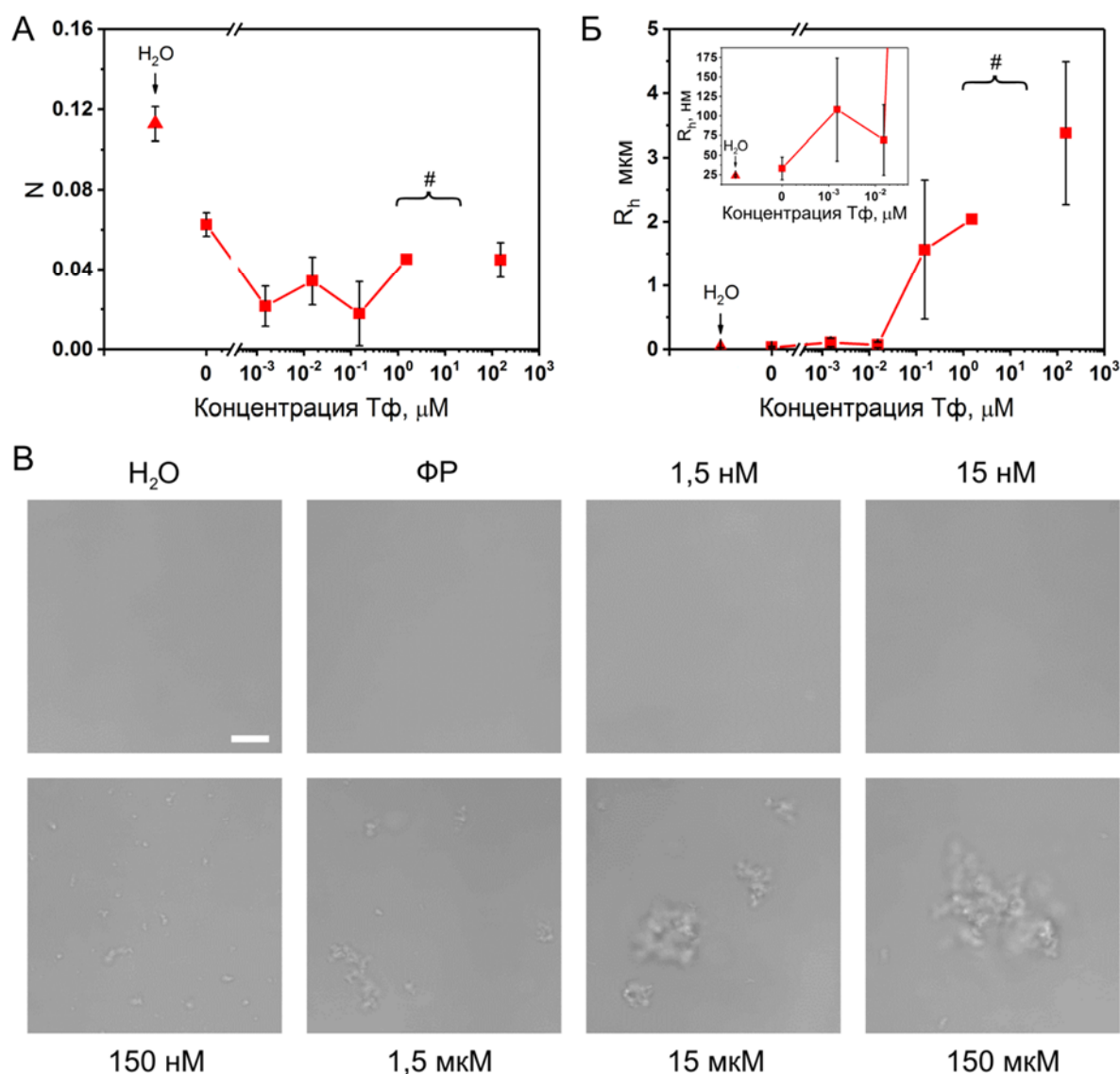


Рисунок 3. Инкубация в течение 10 минут НАФ-ПЭИ с Тф в различных концентрациях при 21 °С. Число частиц НАФ-ПЭИ в наблюдаемом объеме (А) и их гидродинамический радиус (Б) в зависимости от типа раствора и концентрации Тф. Решеткой (#) отмечены концентрации Тф, для которой либо наблюдалась значительная агрегация НАФ-ПЭИ, сопровождаемая большим разбросом значений R_h , либо значения N и R_h не были получены вследствие выпадения агрегатов в осадок. На вставке графика (Б) приведен увеличенный масштаб для малых концентраций Тф. Изображения дна лунок планшета в проходящем свете с растворами НАФ-ПАК в воде, ФР и растворах Тф при различных концентрациях (В). Масштабный отрезок 5 мкм

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии было проведено исследование влияние поверхностного покрытия наноразмерных антистоксовых фосфоров (НАФ) на коллоидную стабильность в растворах трансферрина (Тф). Показано, что, несмотря на кластеризацию, происходящую на стадии покрытия поверхности НАФ полимерами, они сохраняют стабильность в водном растворе в течение длительного времени. Обнаружено, что коллоидная стабильность отрицательно заряженных НАФ-ПАК зависит от числа молекул Тф, приходящихся на одну НЧ. При высоких концентрациях Тф на поверхности НАФ-ПАК образуется монослой белка, который обеспечивает их коллоидную стабильность и может быть использован при разработке тераностических агентов, способных преодолеть гемато-энцефалический барьер. В случае положительно заряженных НАФ-ПЭИ, Тф играет роль коагулянта и приводит к выпадению НЧ в осадок.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00723).

Список литературы / References:

1. Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 2009, vol. 8, no. 7, pp. 543-557. DOI: 10.1038/nmat2442.
2. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. Upconversion nanoparticles and their hybrid assemblies for biomedical applications. *Russian Chemical Reviews*, 2016, vol. 85, no. 12, pp. 1277-1296. DOI: 10.1070/rcr4663.
3. Gu Z.J., Yan L., Tian G., Li S.J., Chai Z.F., Zhao Y.L. Recent Advances in Design and Fabrication of Upconversion Nanoparticles and Their Safe Theranostic Applications. *Advanced Materials*, 2013, vol. 25, no. 28, pp. 3758-3779. DOI: 10.1002/adma.201301197.
4. DaCosta M.V., Doughan S., Han Y., Krull U.J. Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2014, vol. 832, pp. 1-33. DOI: 10.1016/j.aca.2014.04.030.
5. Zhao L., Kutikov A., Shen J., Duan C.Y., Song J., Han G. Stem Cell Labeling using Polyethylenimine Conjugated (α -NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ Upconversion Nanoparticles. *Theranostics*, 2013, vol. 3, no. 4, pp. 249-257. DOI: 10.7150/thno.5432.
6. Chen G.Y., Qiu H.L., Prasad P.N., Chen X.Y. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chemical Reviews*, 2014, vol. 114, no. 10, pp. 5161-5214. DOI: 10.1021/cr400425h.
7. Fan W.P., Bu W.B., Shi J.L. On The Latest Three-Stage Development of Nanomedicines based on Upconversion Nanoparticles. *Advanced Materials*, 2016, vol. 28, no. 21, pp. 3987-4011. DOI: 10.1002/adma.201505678.
8. Liu B., Chen Y.Y., Li C.X., He F., Hou Z.Y., Huang S.S., Zhu H.M., Chen X.Y., Lin J. Poly(Acrylic Acid) Modification of Nd³⁺-Sensitized Upconversion Nanophosphors for Highly Efficient UCL Imaging and pH-Responsive Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*, 2015, vol. 25, no. 29, pp. 4717-4729. DOI: 10.1002/adfm.201501582.
9. Salvati A., Pitek A.S., Monopoli M.P., Prapainop K., Bombelli F.B., Hristov D.R., Kelly P.M., Aberg C., Mahon E., Dawson K.A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotechnology*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. 137-143. DOI: 10.1038/nnano.2012.237.
10. Rocker C., Potzl M., Zhang F., Parak W.J., Nienhaus G.U. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2009, vol. 4, no. 9, pp. 577-580. DOI: 10.1038/nnano.2009.195.
11. Jiang X., Weise S., Hafner M., Rocker C., Zhang F., Parak W.J., Nienhaus G.U. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, vol. 7, pp. S5-S13. DOI: 10.1098/rsif.2009.0272.focus.
12. Gebauer J.S., Malissek M., Simon S., Knauer S.K., Maskos M., Stauber R.H., Peukert W., Treuel L. Impact of the Nanoparticle-Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure. *Langmuir*, 2012, vol. 28, no. 25, pp. 9673-9679. DOI: 10.1021/la301104a.
13. Bharti B., Meissner J., Findenegg G. H. Aggregation of Silica Nanoparticles Directed by Adsorption of Lysozyme. *Langmuir*, 2011, vol. 27, no. 16, pp. 9823-9833. DOI: 10.1021/la201898v.
14. Cukalevski R., Ferreira S.A., Dunning C.J., Berggard T., Cedervall T. IgG and fibrinogen driven nanoparticle aggregation. *Nano Research*, 2015, vol. 8, no. 8, pp. 2733-2743. DOI: 10.1007/s12274-015-0780-4.
15. Ho Y.T., Azman N.A., Loh F.W.Y., Ong G.K.T., Engudar G., Kriz S.A., Kah J.C.Y. Protein Corona Formed from Different Blood Plasma Proteins Affects the Colloidal Stability of Nanoparticles Differently. *Bioconjugate Chemistry*, 2018, vol. 29, no. 11, pp. 3923-3934. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00743.
16. Huhn J., Fedeli C., Zhang Q., Masood A., del Pino P., Khashab N.M., Papini E., Parak W.J. Dissociation coefficients of protein adsorption to nanoparticles as quantitative metrics for description of the protein corona: A comparison of experimental techniques and methodological relevance. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, vol. 75, pp. 148-161. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.12.015.
17. Shang L., Nienhaus G.U. In Situ Characterization of Protein Adsorption onto Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 2017, vol. 50, no. 2, pp. 387-395. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00579.
18. Wang Z.Q., Tian Z.M., Dong Y., Li L., Tian L., Li Y.Q., Yang B.S. Nanodiamond-conjugated transferrin as chemotherapeutic drug delivery. *Diamond and Related Materials*, 2015, vol. 58, pp. 84-93. DOI: 10.1016/j.diamond.2015.06.008.
19. Deshpande P., Jhaveri A., Pattni B., Biswas S., Torchilin V. Transferrin and octaarginine modified dual-functional liposomes with improved cancer cell targeting and enhanced intracellular delivery for the treatment of ovarian cancer. *Drug Delivery*, 2018, vol. 25, no. 1, pp. 517-532. DOI: 10.1080/10717544.2018.1435747.
20. Wang D., Zhu L., Pu Y., Wang J.X., Chen J.F., Dai L.M. Transferrin-coated magnetic upconversion nanoparticles for efficient photodynamic therapy with near-infrared irradiation and luminescence bioimaging. *Nanoscale*, 2017, vol. 9, no. 31, pp. 11214-11221. DOI: 10.1039/c7nr03019c.
21. Zhao J.B., Jin D.Y., Schartner E.P., Lu Y.Q., Liu Y.J., Zvyagin A.V., Zhang L.X., Dawes J.M., Xi P., Piper J.A., Goldys E.M., Monro T.M. Single-nanocrystal sensitivity achieved by enhanced upconversion luminescence. *Nature Nanotechnology*, 2013, vol. 8, no. 10, pp. 729-734. DOI: 10.1038/nnano.2013.171.

22. Dong A. G., Ye X. C., Chen J., Kang Y. J., Gordon T., Kikkawa J. M., Murray C. B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol. 133, no. 4, pp. 998-1006. DOI: 10.1021/ja108948z.
23. Ruttinger S., Buschmann V., Kramer B., Erdmann R., Macdonald R., Koberling F. Comparison and accuracy of methods to determine the confocal volume for quantitative fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Microscopy*, 2008, vol. 232, no. 2, pp. 343-352. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2008.02105.x.
24. Wehry E. L. Principles of fluorescence spectroscopy - Lakowicz, Jr. *American Scientist*, 1984, vol. 72, no. 4, pp. 395-396.
25. Armstrong J. K., Wenby R. B., Meiselman H. J., Fisher T. C. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophysical Journal*, 2004, vol. 87, no. 6, pp. 4259-4270. DOI: 10.1529/biophysj.104.047746.
26. Mahmoudi M., Abdelmonem A. M., Behzadi S., Clement J. H., Dutz S., Ejtehadi M. R., Hartmann R., Kantner K., Linne U., Maffre P., Metzler S., Moghadam M. K., Pfeiffer C., Rezaei M., Ruiz-Lozano P., Serpooshan V., Shokrgozar M. A., Nienhaus G. U., Parak W. J. Temperature: The "Ignored" Factor at the NanoBio Interface. *Acs Nano*, 2013, vol. 7, no. 8, pp. 6555-6562. DOI: 10.1021/nn305337c.

EFFECT OF THE SURFACE COATING OF UPCONVERSION NANOPARTICLES ON THE COLLOIDAL STABILITY IN TRANSFERRIN SOLUTIONS

Vorotnov A.D.¹, Tsaregradskaya A.I.¹, Liang L.³, Yuditsev A.V.¹, Kostyuk A.B.¹, Zvyagin A.V.^{1,3}

¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

Gagarina prosp., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: a.r.t.e.s@mail.ru

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Trubetskaya str., 8/2, Moscow, 119991, Russia

³Macquarie University

Balaclava Road, 2109, Sydney, Australia

Abstract. The colloidal stability of nanoparticles (NPs) plays a key role in their successful usage in various biomedical applications. No matter how well their properties are studied under idealized conditions, everything can change dramatically while interacting with biological objects. In a living organism, NPs are primarily met by proteins, which form a so-called protein corona on their surface. Although in most cases NPs interact with many proteins simultaneously, studies of the interactions of NPs with individual proteins, as well as the consequences to which they lead, are still relevant. In this work, the effect of the surface coating of upconversion nanoparticles (UCNPs) on colloidal stability in transferrin (Tf) solutions was investigated. It is shown that in case of positively charged UCNP-PEI, Tf plays the role of a coagulant and leads to the precipitation of NPs. At the same time, the colloidal stability of negatively charged UCNP-PAA depends on the number of Tf molecules per one NP. So with an excess of Tf in the solution, a monolayer of protein is observed on the surface of UCNP-PAA, which ensures their colloid stability and can be used in the development of theranostics agents capable of overcoming the blood-brain barrier.

Key words: protein corona, upconversion nanoparticles, transferrin, fluorescence correlation spectroscopy, aggregation.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МАГНИТОМАРКИРОВАННЫХ КЛЕТОК *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Беспалова С.В.¹, Кладько Д.В.¹, Легенький Ю.А.¹, Павлов В.Н.¹, Глазунова В.А.²

¹Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 83055, ДНР

²Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина

ул. Розы Люксембург, 72, г. Донецк, 283050, ДНР; e-mail: yu-legen@mail.ru, dan.kladko@yandex.ru

Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. В данной работе исследовалось влияние низкочастотного переменного магнитного поля на жизнеспособность и магнитные свойства магнитомакированных и нативных дрожжевых клеток. В результате магнитной маркировки с разной внеклеточной концентрацией магнитных наночастиц в среде культивирования были получены образцы суспензий жизнеспособных магнитомакированных дрожжевых клеток с различной магнитной восприимчивости, а, следовательно, с различной степенью насыщенности клеток магнитными наночастицами. Измерения жизнеспособности клеток показали, что процедура магнитной модификации снижает жизнеспособность клеток не более чем на 30% по сравнению с нативными клетками. Установлено, что под действием переменного магнитного поля клетки теряют жизнеспособность тем сильнее, чем выше частота магнитного поля. Оценка метаболической активности клеток с помощью теста силы подкисления показала, что ингибирование клеточных процессов переменным магнитным полем усиливается при повышении частоты магнитного поля в исследованном диапазоне. Наибольший эффект ингибирования жизнеспособности переменным магнитным полем при сравнении нативных и магнитомакированных клеток наблюдается у нативной дрожжевой суспензии.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, магнитная модификация, переменное магнитное поле, дрожжевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время магнитные наночастицы оксидов железа нашли широкое применения в биомедицинской области, охватывающей направления адресной доставки лекарств, контрастирующих агентов для МРТ и, в частности, в качестве агентов для магнитной гипертермии и механических актуаторов. В научной литературе широко известно применение магнитных наночастиц в качестве преобразователей энергии высокочастотного переменного магнитного поля (ПМП) в тепло, что позволяет уничтожать раковые клетки посредством действия губительной для них температуры [1].

Однако такое лечение является рискованным, особенно вблизи термочувствительных структур, так как индукция тепла не может контролироваться в пространстве с высокой точностью и может вызвать некроз тканей [2]. Поэтому в данной работе внимание сфокусировано на применение магнитных наночастиц в качестве преобразователя энергии магнитного поля не в тепло, а в механическое воздействие на клетки [3], достигаемое использованием низкочастотного переменного магнитного поля.

Кроме непосредственно действия переменного магнитного поля на магнитные наночастицы, также остается вопрос безопасности действия такого поля на нативные клетки. Одним из эффектов, который может вызвать действие переменного магнитного поля, является наведение индукционных токов. Данное обстоятельство способно вызывать электрические пробои мембран и локально увеличивать температуру клеток и тканей [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве агентов для маркировки клеток в данной работе использовались магнитные наночастицы магнетита, синтезированные по методике, представленной в работе [5]. Концентрацию железа в полученном коллоиде магнитных наночастиц определяли с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии (Сатурн-ЗПА1). Магнитная модификация дрожжевых клеток проводилась по методике, аналогично работе [6]. В процессе магнитной маркировки к 2 мл отмытой дрожжевой суспензии вносили феррожидкость в объемах, которые обеспечивали следующие концентрации наночастиц магнетита (в пересчете на количество Fe, приходящееся на одну клетку): 1,5 пг, 3 пг и 5 пг на клетку. Распределение магнитных наночастиц на поверхности клеток исследовалось с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM 200A.

После магнитной маркировки на клетки воздействовали низкочастотным переменным магнитным полем, имеющим частоты 10 и 20 Гц с амплитудой равной 7 мТл, в течение 20 минут при постоянной температуре, которая контролировалась медь-константановой термопарой. Оценка магнитных свойств клеток до и после воздействия переменным магнитным полем проводили с помощью магнитофореза в специальной ячейке [5] и с помощью метода Фарадея (рис. 1).

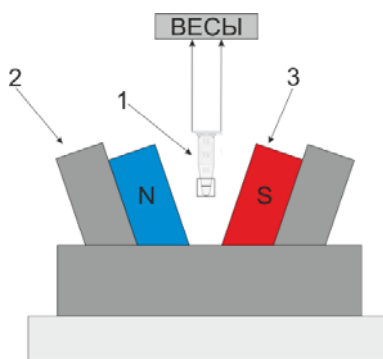


Рисунок 1. Схема выполнения измерения в методе Фарадея. 1 – измеряемая пробирка с веществом, которая находится в участке с постоянным силовым фактором системы (обозначено квадратом), 2 – основа магнитной системы, 3 – магниты, создающие в области измерения постоянный градиент магнитного поля

В нашем случае измерения по методу Фарадея заключаются в определении разницы между кажущейся массой m_2 образца 1 (см. рисунок 1), измеренной в неоднородном магнитном поле магнитной системы 3, и истинной массой этого образца m_1 , измеренной без приложения магнитного поля, возникающей за счет магнитной силы, действующей параллельно силе тяжести на образец 1 с магнитной восприимчивостью χ в неоднородном магнитном поле магнитной системы 3. Из величины магнитной силы $\Delta mg = (m_2 - m_1)g$, действующей на образец 1, вычисляется магнитная восприимчивость этого образца по формуле (1):

$$\chi = \frac{\Delta mg}{H \nabla H \cdot V}, \quad (1)$$

где χ – магнитная восприимчивость образца; Δm – разность масс образца 1, измеренных в магнитном поле и без него, кг; $H \nabla H$ – произведение напряженности магнитного поля на её градиент A^2/m^3 ; V – объем образца, m^3 .

Зная магнитную восприимчивость образца, содержащего измеренное с помощью камеры Горяева количество магнитомаркированных клеток, вычислялась магнитная восприимчивость клеток. В объеме образца V находится известное количество клеток N , определенное в камере Горяева. Магнитная сила, действующая на клетку, определяется как:

$$F_m = \mu_0 V_k \chi_k N H \nabla H, \quad (2)$$

где χ_k – магнитная восприимчивость клеток; V_k – объем клетки, m^3 ; N – число клеток в объеме образца.

Эта сила равна величине определяемой магнитной силы Δmg . Из этого равенства сил находим магнитную восприимчивость клеток χ_k :

$$\chi_k = \frac{\Delta mg}{\mu_0 V_k N H \nabla H}. \quad (3)$$

Оценку жизнеспособности дрожжевых клеток до и после воздействия переменным магнитным полем проводили с помощью метода прижизненного окрашивания клеток метиленовым синим с подсчетом количества живых и мертвых клеток в камере Горяева и теста «силы подкисления» [7]. В его основе лежит определение уровней спонтанного и индуцированного снижения внеклеточного pH дрожжевой суспензии. Эти уровни отражают содержание гликогена в клетке (спонтанное подкисление) и протекание гликолитического пути метаболизма у дрожжей (индуцированное подкисление). Для определения спонтанного, индуцированного и общего подкисления биомассу клеток, маркированную наночастицами Fe_3O_4 при определенной концентрации, суспендировали в 30 мл дистиллированной воды, после чего регистрировали изменение уровня водородного показателя в течение 10 минут (это этап спонтанного подкисления) с помощью pH-метра ULAB MP551. По истечении этого времени вносили 5 мл 20% раствора глюкозы и фиксировали показания pH ещё на протяжении 10 минут (этап индуцированного подкисления). Показатель ΔpH определялся по формуле:

$$\Delta pH = pH_0 - pH_{20}, \quad (4)$$

где pH_0 – показатель водородного потенциала в первую минуту измерения; pH_{20} – значение водородного потенциала на 20-й минуте проведения теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

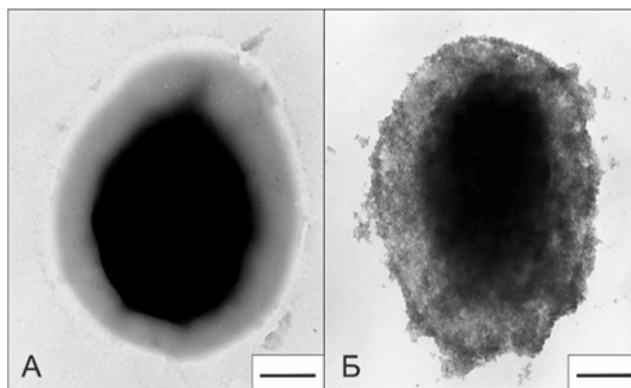


Рисунок 2. Фотографии нативной (А) и магнитомаркированной дрожжевой клетки (Б), полученной с помощью просвечивающей электронной микроскопии (увеличение 7000х). Линейка – 1 мкм

В результате магнитной маркировки с разной внеклеточной концентрацией магнитных наночастиц в среде культивирования были получены образцы суспензий жизнеспособных магнитомаркированных дрожжевых клеток с различной магнитной восприимчивостью. Фотографии, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 2) показывают, что клетки захватывают значительное количество магнитных наночастиц, которые в большей степени концентрируются на поверхности клеточной стенки и в периплазматической области дрожжевой клетки (рис. 2Б).

Данное обстоятельство говорит о высокой эффективности магнитной модификации клеток, в результате чего такими клетками возможно легко управлять с помощью градиентных магнитных полей и появляется возможность воздействовать на магнитомаркированные клетки переменным магнитным полем с помощью магнито-механической трансдукции. Измерения жизнеспособности клеток показали, что процедура магнитной модификации снижает жизнеспособность клеток не более чем на 30% по сравнению с нативными клетками (рис. 3), что говорит об отсутствии сильного цитотоксического действия магнитных наночастиц в данном диапазоне концентраций наночастиц.

Воздействие низкочастотного магнитного поля на магнитомаркированные и нативные клетки повлияло на их жизнеспособность (рис. 4). В частности, после обработки магнитным полем с частотой 10 Гц доля мертвых клеток в суспензии клеток увеличивается на 15%, а при частоте 20 Гц – на 30%. При этом стоит отметить, что наибольшее подавление жизнеспособности обнаруживается в нативной суспензии.

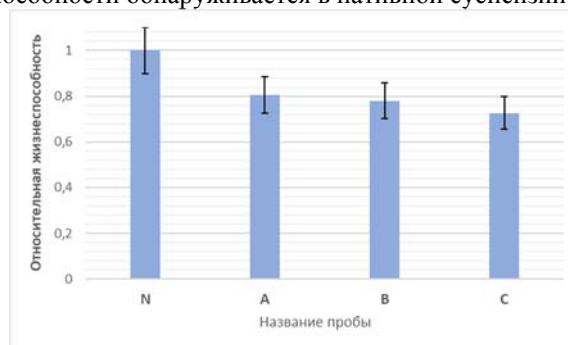


Рисунок 3. Относительная жизнеспособность клеток после процедуры магнитной модификации. Шифр названия проб: N – нативные; A, B, C – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно

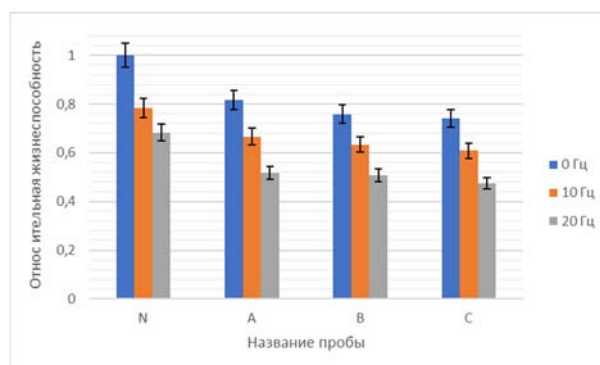


Рисунок 4. Изменение относительной жизнеспособности клеток после обработки переменным магнитным полем с частотами 10 и 20 Гц. Шифр названия проб: N – нативные; A, B, C – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно

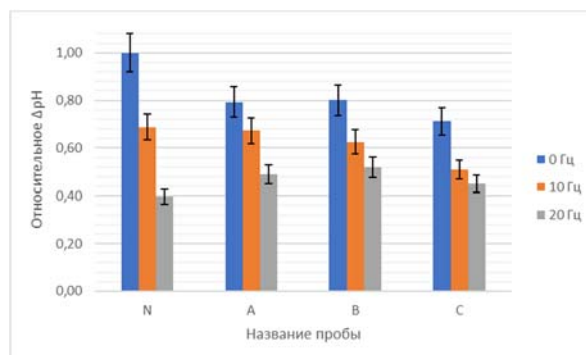


Рисунок 5. Изменение относительной ΔpH после обработки переменным магнитным полем с частотами 10 и 20 Гц. Шифр названия проб: N – нативные; A, B, C – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно

Оценка метаболической активности клеток с помощью теста силы подкисления показала, что переменное магнитное поле ингибирует клеточные процессы тем сильнее, чем выше частота магнитного поля в данном диапазоне частот (рис. 5). Необходимо отметить, что, аналогично данным по камере Горяева, наибольшее подавление выделения протонов во внеклеточную среду при проведении теста подкисления наблюдается у нативных дрожжевых клеток после обработки переменным магнитным полем.

Оценка магнитных свойств магнитомаркированных клеток показала, что образцы суспензий магнитомаркированных дрожжевых клеток имели различную магнитную восприимчивость, возрастающую в ряду A, B, C (рис. 6). При этом нами не обнаружено изменение магнитных свойств клеток после обработки переменным магнитным полем. Данный результат говорит об отсутствии деградации магнитных свойств клеток под воздействием низкочастотного магнитного поля с исследованными параметрами и о хорошем закреплении магнитных наночастиц на клетках.

Механизмы действия низкочастотных магнитных полей небольшой амплитуды на биологические объекты на данный момент не объяснены и интенсивно обсуждаются в научной литературе [5]. Так как в настоящем исследовании показано, что ингибирование жизнеспособности и метаболических процессов для магнитомаркированных дрожжевых клеток в ПМП проявляется менее сильно, чем для нативных клеток, следовательно, явления, связанные с магнитной механотрансдукцией, не играют заметной роли в исследованном диапазоне параметров ПМП. Возможным объяснением данных по снижению жизнеспособности может быть действие наведенных индукционных токов на дрожжевые клетки. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что наибольший эффект снижения жизнеспособности проявляется на нативных клетках, а не на магнитомаркированных, как следовало бы ожидать при механическом действии наночастиц на клеточную стенку и мембрану магнитомаркированных клеток в переменном магнитном поле. Данный факт позволяет предположить, что магнитные наночастицы на клетках обеспечили экранирование клеточной мембраны от действия ПМП, тем самым магнитная маркировка способствует более легкому перенесению маркированными клетками неблагоприятного фактора в виде переменного магнитного поля. Кроме того, данный результат позволяет говорить о том, что для появления эффектов механического воздействия наночастиц на клетки требуются другие режимы обработки клеток переменным магнитным полем.

Таким образом, результаты проведенного исследования демонстрируют принципиальную возможность использования низкочастотного переменного магнитного поля для регулирования жизнеспособности и метаболической активности как магнитомаркированных клеток, так и нативных. Поэтому вопрос применения такого магнитного поля в терапии требует дальнейших исследований в области безопасности и селективности использования по отношению к здоровым клеткам, не имеющим магнитных наночастиц.

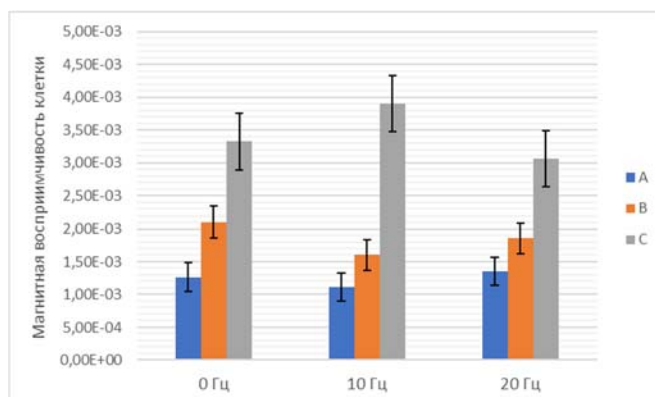


Рисунок 6. Магнитная восприимчивость клеток, усредненная по измерениям двумя методами. A, B, C – магнитомаркированные клетки при концентрации железа 1,5, 3 и 5 пг на клетку, соответственно

Список литературы / References:

1. Bettina Kozissnik, Ana C. Bohorquez, Jon Dobson & Carlos Rinai. Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity. *International Journal of Hyperthermia*, 2013, vol. 29, no. 8, pp. 706-7142.
2. Ahmed M., Brace C.L., Lee F.T., Goldberg S.N. Principles of and Advances in Percutaneous Ablation. *Radiology*, 2011, vol. 258, pp. 351-369.
3. Zhang E., Kircher M.F., Koch X.M., Eliasson L., Goldberg S.N., Renstro E. Dynamic Magnetic Fields Remote Control Aporptosis via Nanoparticle Rotation. *ACS Nano*, 2014, vol. 8, pp. 3192-3201.
4. Турчин В.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В., Попандопуло А.Г., Беспалова С.В., Фисталь Э.Я. Магнитофоретические свойства фетальных фибробластов человека, маркированных суперпарамагнитными наночастицами оксида железа, стабилизированными цитратом. *Гены и клетки*, 2017, т. 12, вып. 1, с. 47-53. [Turchyn V.V., Legenkiy Yu.A., Solopov M.V., Popandopulo A.G., Bespalova S.V., Fistal E.Ya. Magnetophoretic properties of human fetal fibroblasts magnetically labeled with citrate stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Genes and cells*, 2017, vol. 12, iss. 1, pp. 47-53. (In Russ.)]
5. Бинги В. Н. *Принципы электромагнитной биофизики*. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011, 592 с. [Binhi V.N. *Principles of electromagnetic biophysics*. Moscow: FIZMATLIT, 2011, 592 p. (In Russ.)]
6. Беспалова С.В., Кладко Д.В., Легенький Ю.А. Влияние постоянного магнитного поля на процесс магнитной модификации *Saccharomyces cerevisiae*. I Всероссийская конференция с международным участием «Физика и экология ЭМИ», п. Агой, 2017, Научные труды конференции, т. 1, с. 3-4. [Bespalova S.V., Kladko D.V., Legenkiy Yu.A. Influence of static magnetic field on magnetic modification of yeast cells. I Russian conference with international participation "Physics and Ecology of EMP", Agoy, 2017, Conference proceedings, vol. 1, p. 3-4. (In Russ.)]
7. Kara B.V., Simpson W.M., Hammond R.M. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *Journal of the Institute of Brewing*, 1988, no. 94, pp. 153-158.

INFLUENCE OF LOW-FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD ON VIABILITY OF MAGNETICALLY MODIFIED YEAST CELLS**Bespalova S.V.¹, Kladko D.V.¹, Legenkiy Yu.A.¹, Pavlov V.N.¹, Glazunova V.A.²**¹Donetsk National University*Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283050, DPR*²A.A. Galkin Donetsk Physicotechnical Institute*Rose Luxemburg str., 72, Donetsk, 283050, DPR; e-mail: yu-legen@mail.ru, dan.kladko@yandex.ru*

Abstract. In this paper, we studied the influence of a low-frequency alternating magnetic field on viability and magnetic properties of magnetically modified and native yeast cells. As a result of magnetic labeling with different extracellular concentration of magnetic nanoparticles in the culture medium, samples of suspensions of viable magnetically labeled yeast cells with different magnetic susceptibility were obtained. Measurements of cell viability showed that the procedure of magnetic modification reduces cell viability less than 30% compared with native cells. It was found that under the action of an alternating magnetic field, cells lose their viability in frequency-dependent manner. The greatest effect of inhibiting viability by an alternating magnetic field is in the native yeast suspension. In addition, we found no significant changes in the magnetic properties of cells after their treatment by alternating magnetic field. A possible explanation of the viability data might be the action of inductive currents on yeast cells.

Key words: magnetic nanoparticles, magnetic labeling, alternating magnetic field, yeast cells.

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ВЯЗКОСТНЫХ СВОЙСТВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Сороко С.С.¹, Юдинцев А.В.¹, Костюк А.Б.¹, Лермонтова С.А.^{1,2}, Плеханов В.И.³, Клапшина Л.Г.^{1,2}, Балалаева И.В.¹, Шилягина Н.Ю.¹

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ

² Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН
ул. Тропинина, 49, г. Нижний Новгород, 603137, РФ

³ Институт прикладной физики РАН
ул. Ульянова 46, Нижний Новгород, 603155, РФ; e-mail: kastarashan@gmail.com

Аннотация. Фотодинамическая терапия – это интенсивно развивающийся метод лечения онкологических заболеваний, основанный на избирательном накоплении в опухоли фотосенсибилизатора и последующей его локальной активации видимым светом в присутствии кислорода тканей, приводящей к образованию свободных радикалов, токсичных для окружающих клеток. В настоящее время метод фотодинамической терапии имеет ряд нерешенных задач, среди которых можно выделить проблему отсутствия раннего контроля эффективности лечения и эмпирический характер подбора доз облучения. Известно, что фотодинамическая гибель клеток сопровождается значительным увеличением внутриклеточной вязкости. Одним из способов оценки внутриклеточной вязкости является использование флуоресцентных молекулярных роторов – соединений квантовый выход и время жизни флуоресценции которых увеличиваются с ростом вязкости. Ранее было показано, что тетраакис(4-фторфенил)тетрацианопорфиразин является флуоресцентным молекулярным ротором и агентом для фотодинамической терапии. В настоящей работе нами была проведена оценка дозозависимых изменений вязкостных свойств опухолевых клеток при фотодинамической терапии с порфиразином методом время-разрешенной микроскопии. Нами было показано, что фотодинамический ответ опухолевых клеток, индуцированный порфиразином, носит дозозависимый характер, который проявляется во временной задержке увеличения внутриклеточной вязкости с момента облучения. В свою очередь увеличение вязкости коррелирует с деструктивными морфологическими изменениями клеток.

Ключевые слова: порфиразин, фотодинамическая терапия, молекулярный ротор, вязкость, FLIM.

ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – интенсивно развивающийся метод лечения онкологических заболеваний, основанный на избирательном накоплении в опухоли красителя-флуорофора (фотосенсибилизатора) и последующей его локальной активации видимым светом в присутствии кислорода тканей, приводящей к образованию свободных радикалов, токсичных для окружающих клеток [1]. В сравнении с классическими методами лечения онкологических заболеваний ФДТ обладает рядом преимуществ: минимальная токсичность препарата для здоровых тканей, отсутствие механизмов приобретения резистентности к используемым препаратам, возможность амбулаторного проведения процедуры [2]. Однако метод ФДТ не лишен недостатков, среди которых можно выделить проблему эмпирического характера подбора режимов светового воздействия и отсутствие раннего контроля эффективности лечения [3].

Известно, что при фотодинамическом воздействии гибель опухолевых клеток сопровождается значительным увеличением внутриклеточной вязкости [4]. На сегодняшний день одним из подходов к оценке внутриклеточной вязкости является использование флуоресцентных молекулярных роторов. Молекулярные роторы – это соединения, состоящие из двух или более групп, способных вращаться друг относительно друга. Вращение группировок осуществляется за счет передачи энергии извне, к примеру, в результате механического воздействия или кванта света. Квантовый выход и время жизни флуоресценции молекулярных роторов существенным образом зависят от вязкости среды, что математически выражается в уравнениях Ферстера-Хоффмана (уравнения 1, 2) [5].

$$\lg(\varphi) = z + \alpha \lg(\eta), \quad (1)$$

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

$$\lg(\tau) = \lg(z/k_r) + \alpha \lg(\eta), \quad (2)$$

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

В случае, когда вращение группировок молекулярного ротора относительно друг друга невозможно, вследствие стерических затруднений или высокой вязкости раствора, возрастает квантовый выход

флуоресценции и время жизни флуоресценции молекулярного ротора [6]. Степень вязкостной чувствительности молекулярных роторов выражается коэффициентом α (уравнения 1-2), который может находиться в диапазоне 0,33-0,69.

Ранее нами было синтезировано ряд соединений, включая тетраakis(4-фторфенил)тетрацианопорфиразин (Pz), сочетающих свойства фотосенсибилизатора и молекулярного ротора [7, 8]. В предыдущих экспериментах на культурах опухолевых клеток нами было показано, что при фотодинамической гибели клеток, индуцированной Pz, происходит увеличение квантового выхода и времени жизни флуоресценции Pz, вследствие, как мы полагаем, увеличения внутриклеточной вязкости или возникновения иных стерических затруднений [7].

Целью данной работы стало исследование дозовой зависимости индуцированного фотодинамическим воздействием изменения вязкости опухолевых клеток, оцениваемой по времени жизни возбужденного состояния Pz.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое соединение. В работе исследовали соединение порфиразиновой природы – тетраakis(4-фторфенил)тетрацианопорфиразин, синтезированное в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН методом темплатной сборки [7]. Структурная формула Pz представлена на рисунке 1.

Ранее нами было показано, что Pz поглощает в диапазоне 560-650 нм, флуоресцирует в диапазоне 640-700 нм, накапливается в опухолевых клетках и проявляет фотодинамическую активность [9].

Исследование зависимости времени жизни Pz от вязкости среды. На первом этапе исследования для построения калибровочных кривых зависимости времени жизни флуоресценции Pz от вязкости среды (рис. 2) использовали спиртоглицериновые растворы с различным процентным содержанием глицерина с известными значениями вязкости [10]. В приготовленные растворы добавляли Pz (5 мкМ) и регистрировали средневзвешенное время жизни флуоресценции с помощью метода время-разрешенного флуоресцентного имиджинга (fluorescence lifetime imaging, FLI) на установке для время-коррелированного счета одиночных фотонов (ИПФ РАН, Россия) на основе платы SPC-150 (Becker & Hickel, Германия). Измерения проводили при комнатной температуре. Полученные данные аппроксимировали биэкспоненциальной зависимостью. Аппроксимация биэкспоненциальной зависимостью была выбрана на основании наименьшего значения коэффициента детерминации. Биэкспоненциальная зависимость свидетельствует о наличии двух типов излучательных центров у Pz. В результате оценивалось средневзвешенное время жизни флуоресценции Pz:

$$\tau_i = \frac{a_1\tau_1^2 + a_2\tau_2^2}{a_1\tau_1 + a_2\tau_2}, \quad (3)$$

где a_1 – доля 1-компоненты, a_2 – доля 2-компоненты, τ_1 – время жизни возбужденного состояния 1-компоненты, τ_2 – время жизни возбужденного состояния 2-компоненты.

Клеточная культура. Эксперименты проводили с использованием клеточной линии эпидермоидной карциномы кожи человека A431. Клетки культивировали в 25 см²-культуральных флаконах (Corning, США) при температуре 37 °C и содержании CO₂ в воздухе 5%. В качестве питательной среды использовали DMEM (HyClone, США), с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия). Для снятия клеток с культурального флакона использовали раствор трипсин:ЭДТА (1:1) (ПанЭко, Россия), для промывки клеток использовали 10 мМ фосфатно-солевой буфер (PBS).

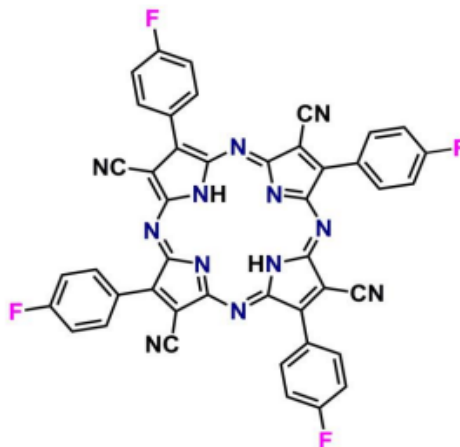


Рисунок 1. Структурная формула тетраakis(4-фторфенил)тетрацианопорфиразина (Pz)

Анализ жизнеспособности клеток. Анализ жизнеспособности клеточной культуры A431 проводили при помощи МТТ-теста. Клетки инкубировали с Pz в культуральной среде без сыворотки в течение 4 часов в темноте. Для оценки световой токсичности Pz осуществляли световое воздействие в диапазоне длин волн 615-635 нм в дозе 20 Дж/см² с помощью светодиодной установки для создания равномерного светового потока в стандартных 96-луночных планшетах [4]. МТТ-реагент (Alfa Aesar, Великобритания) добавляли в ростовую среду в конечной концентрации 0,5 мг/мл и далее клетки инкубировали с МТТ-красителем в течение 4 часов. После чего инкубационную среду отбирали и растворяли образовавшийся окрашенный МТТ-формаза в мкл диметилсульфоксида. Жизнеспособность клеток оценивали по отношению значения оптической плотности раствора формаза в каждой пробе к контролю (без фотосенсибилизатора). Измерение проводили на планшетном спектрофотометре Synergy MX на длине волны 570 нм. Полученные зависимости доза-эффект использовали для расчета дозы приводящей к ингибированию роста культуры клеток на 50% (IC₅₀) (GraphPad Prism, США).

Время-разрешенная флуоресцентная микроскопия. Для исследования дозозависимого изменения вязкостных свойств опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии клетки A431 сажали в лунки тонкодонного 96-луночного планшета (Corning, США) в количестве 40 тыс. клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. Затем питательную среду заменяли на 200 мкл раствора Pz (5 мкМ) в среде DMEM без сыворотки. Клетки инкубировали с Pz 1,5 часа в CO₂-инкубаторе. Данное время инкубации с Pz было выбрано на основании предварительных экспериментов.

Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа AxioObserver Z1 LSM 710 Duo NLO (Carl Zeiss, Германия), оборудованного системой время-разрешенного флуоресцентного имиджинга FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) (Becker & Hickl, Германия). Флуоресценцию Pz возбуждали в двухфотонном режиме импульсным фемтосекундным лазером на длине волны 800 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 640-710 нм. Время жизни флуоресценции измеряли до и каждые 30 минут в течение 4 часов после фотодинамического воздействия. В результате получали псевдоцветные изображения клеток, на которых цветом закодировано время жизни флуоресценции Pz, и кривые затухания флуоресценции в каждой точке изображения, которые аппроксимировали биэкспоненциальной зависимостью. При анализе изображений получали усредненные значения времен жизни флуоресценции Pz в выбранных областях интереса с помощью программы SPCImage (Becker & Hickl, Германия).

Фотодинамическое воздействие осуществляли через объектив микроскопа лазером с длиной волны 594 нм в дозах 5-50 Дж/см². Облучению подвергалась половина поля зрения микроскопа, вторая половина поля зрения использовалась в качестве контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования для пересчета значений времен жизни флуоресценции (τ) Pz в клетке в значения внутриклеточной вязкости (η) были измерены времена жизни флуоресценции Pz в спиртоглицериновых растворах с различным процентным содержанием глицерина и получено уравнение прямой зависимости времени жизни флуоресценции Pz от вязкости в логарифмических координатах (рис. 2). Коэффициент вязкостной чувствительности α для Pz составил 0,62.

Следует отметить, что внутриклеточная вязкость не является величиной однозначной для целой клетки и отличается в различных ее точках. Цитоплазма является гетерогенной структурой, что влияет на вязкость в разных ее участках. Поэтому в случае внутриклеточной вязкости можно говорить о «кажущейся» вязкости или локальном микроокружении порфиразина и полученные рассчитанные значения вязкости позволяют лишь сделать условную оценку [11].

Оценка темновой и световой токсичности Pz в отношении клеток A431 в культуре показала, что IC₅₀ при инкубации в темноте и на свету составляет 8,4 мкМ и 0,74 мкМ, соответственно (рис. 3).

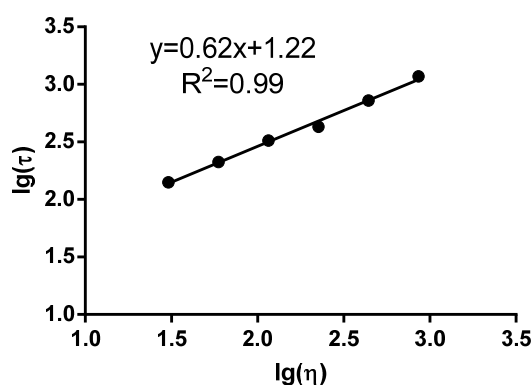


Рисунок 2. Зависимость времени жизни флуоресценции Pz от вязкости спиртоглицеринового раствора

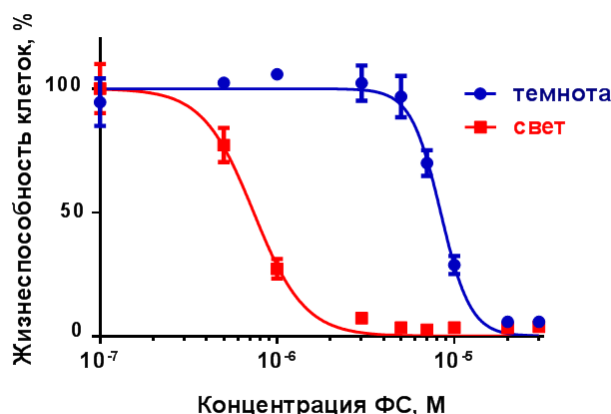


Рисунок 3. Кривая жизнеспособности клеток A431 в зависимости от концентрации Pz в темноте и при облучении светом 615-635 нм в дозе 20 Дж/см²

Для оценки дозозависимых изменений внутриклеточной вязкости опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии были получены изображения клеток, предынкубированных с Pz (5 мкМ, 1,5 часа). Изображения приведены в псевдоцветной палитре, где цветом в каждом пикселе закодировано средневзвешенное время жизни флуоресценции Pz (рис. 4). Хорошо видно, что в облученной области (левая часть изображения) после фотодинамического воздействия происходят значительные морфологические изменения клеток: сжатие, ошаривание и последующее открепление клеток от подложки культурального планшета. Данные изменения могут свидетельствовать о начавшейся гибели клеток в результате фотодинамического воздействия, индуцированного Pz. При дозе 5 Дж/см² эти изменения менее выражены, предположительно необходимо больше времени на развитие необратимых деструктивных реакций в клетках для наступления выраженных морфологических изменений. В необлученной области морфологических изменений клеток практически не наблюдается, небольшие изменения связаны с режимом сканирования клеток во время получения изображения. Кроме того, замечено значительное увеличение времени жизни флуоресценции Pz с 600 до 1100 пс (в 1,5-2 раза) в облученной области. По нашим предположениям эти изменения времен жизни флуоресценции в клетке связаны с изменением локального микроокружения Pz вследствие начавшихся процессов клеточной гибели, приводящих к увеличению микровязкости. В необлученной области значительного изменения времен жизни флуоресценции не было выявлено.

Полученные значения времен жизни флуоресценции Pz пересчитывали в значения «кажущейся» вязкости с помощью уравнения Ферстера-Хоффмана с использованием коэффициентов, полученных в экспериментах на средах известной вязкости. Зависимость изменения вязкости от дозы и времени после облучения представлена на рисунке 5.

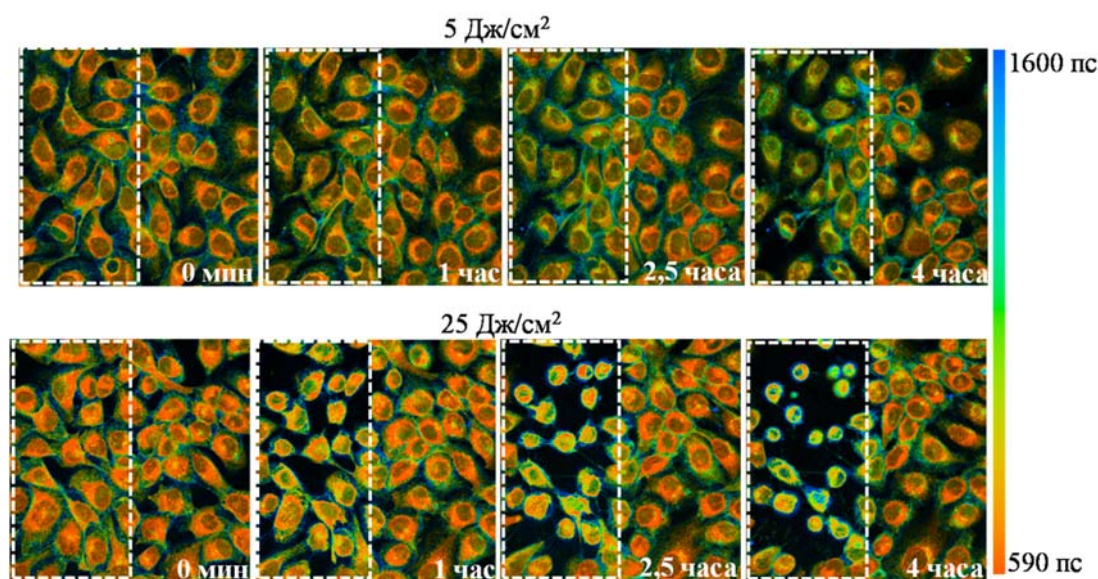


Рисунок 4. Псевдоцветные изображения клеток А-431 до и после проведения фотодинамического воздействия в дозах 5 Дж/см² и 25 Дж/см². Облучаемый участок выделен пунктиром. Инкубация Pz 1,5 часа (5 мкМ). Цветом закодировано средневзвешенное время жизни флуоресценции Pz. $\lambda_{\text{ex}} = 800$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 640-710$ нм. Размер изображений 212x212 мкм

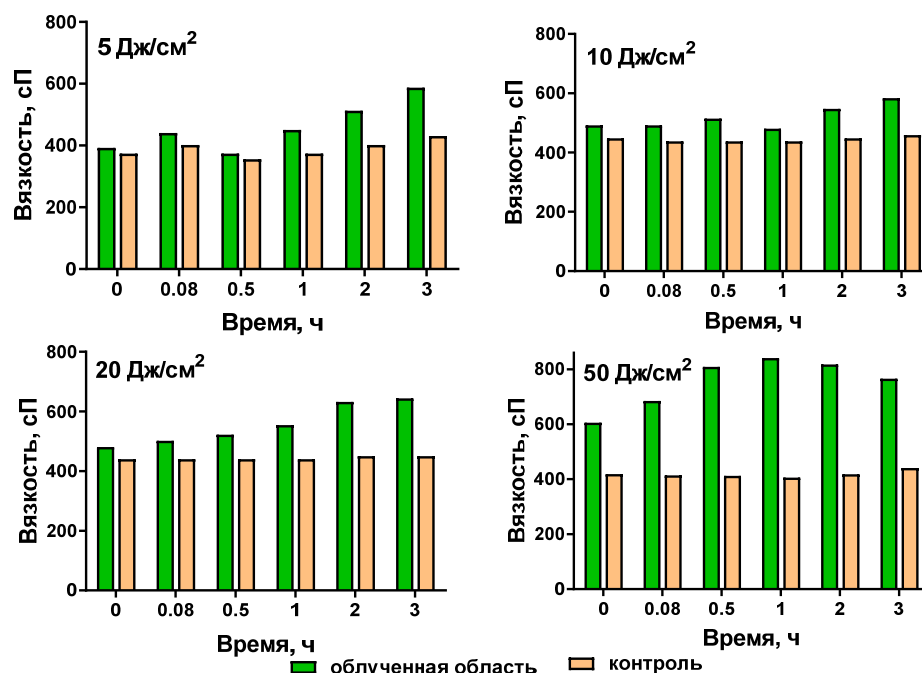


Рисунок 5. Зависимость внутриклеточной вязкости клеток A431 от времени после фотодинамического воздействия в облученной и необлученной области при различных световых дозах

По полученным данным хорошо видно, что при фотодинамическом воздействии проявляется дозозависимый эффект, который выражается во времени наступления фотодинамического ответа в виде увеличения внутриклеточной вязкости, коррелирующей с морфологическим состоянием клеток. При меньших дозах ответ наступает позднее, и он менее выражен, чем при больших дозах. К примеру, при облучении в дозах 20-50 Дж/см² происходит увеличение времени жизни флуоресценции Pz в 1,5-2 раза (от 800 пс до 1400 пс), и, при пересчете в вязкость, в 2 раза (от 400 сП до 850 сП) сразу после облучения. При дозах 5 и 10 Дж/см² изменения времени жизни флуоресценции и, соответственно, внутриклеточной вязкости менее выражены и наступают значительно позже: через час и 30 минут, соответственно. По нашим предположениям при больших дозах Pz получает достаточно энергии, чтобы запустить необратимые свободнорадикальные реакции, приводящие к значительным необратимым изменениям в клетках. Предположительно, при больших дозах синглетный кислород, действуя на молекулу-мишень, запускает множество деструктивных реакций (изменение жирнокислотного состава и упаковки мембран, образование оснований Шиффа, денатурация белков), приводящих к стремительному увеличению внутриклеточной вязкости [12, 13]. При меньших дозах, образовавшихся при фотодинамическом воздействии первичных радикалов недостаточно для развития деструктивных процессов в клетке, однако со временем они могут развиваться вследствие вырожденно-разветвленного характера свободнорадикальных реакций. Таким образом, по нашим предположениям, увеличение вязкости зависит от мощности оксидативного стресса, который регулируется дозой света.

Таким образом, нами показана дозовая зависимость ответа опухолевых клеток на фотодинамическое воздействие с Pz. Чем выше доза облучения, тем раньше возникает ответ, выражающийся в увеличении времени жизни флуоресценции Pz, а, следовательно, увеличении внутриклеточной вязкости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что вязкостной ответ клетки на фотодинамическое воздействие существенным образом зависит от дозы света. При небольших световых дозах ответ клетки, выраженный в увеличении внутриклеточной вязкости, коррелирующей с деструктивными морфологическими изменениями, развивается в течение длительного периода времени. Мы предполагаем, что необратимые морфологические изменения клеток, приводящие к гибели клетки, индуцированной высокими световыми дозами, наступают при достижении определенного порога увеличения вязкости. Полученные результаты дают основания полагать, что использование Pz в качестве вязкостного сенсора и одновременно фотодинамического агента позволит проводить дозиметрический контроль фотодинамической терапии с последующим прогнозом её эффективности в каждом конкретном случае.

Работа выполнена в рамках Госзадания №6.3099.2017/ПЧ.

Список литературы / References:

1. Hamblin M.R., Mroz P. *History of PDT: The first hundred years. In: Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical.* Norwood, MA: Artech House, Inc, 2008.
2. Celli J.P., Spring B.Q. [et al.] Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev*, 2010, vol. 110, no. 5, pp. 2795-2838.
3. Гамаюнов С.В., Шахова Н.М., Денисенко А.Н. [и др.] Фотодинамическая терапия – преимущества новой методики и особенности организации службы. *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2014, № 2, с. 101-104. [Gamayunov S.V., Shakhova N.M., Denisenko A.N. and others. Photodynamic therapy - the advantages of a new technique and features of the organization of service. *Tihookeanskii medicinskii jurnal*, 2014, no. 2, pp. 101-104. (In Russ.)]
4. Kuimova M.K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, vol. 14, no. 37, pp. 12671-12686.
5. Haidekker M., Brady T., Wen K., Okada C., Stevens H., Snell J., Frangos J., Theodorakis E. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 33, no. 6, pp. 415-425.
6. Ужинов Б.М., Иванов В.Л., Мельников М.Я. Молекулярные роторы – люминесцентные сенсоры локальной вязкости и вязкого течения в растворах и биологических системах. *Успехи химии*, 2011, т. 80, № 12, с. 1231-1243. [Uzhinov B.M., Ivanov V.L., Melnikov M.Ya. Molecular rotors - luminescent sensors of local viscosity and viscous flow in solutions and biological systems. *Uspehi himii*, 2011, vol. 80, no. 12, pp. 1231-1243. (In Russ.)]
7. Izquierdo M., Angeles, Vyšniauskas Aurimas, Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Kuimova M.K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers during photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, no. 3, pp. 1089-1096.
8. Lermontova S., Grigorev I., Shilyagina N., Peskova N., Balalaeva I., Shirmanova M., Klapshina L. New Porphyrazine Macrocycles with High Viscosity-Sensitive Fluorescence Parameters. *Russian Journal of General Chemistry*, 2016. vol. 86, no. 6, pp. 1011-1018.
9. Shilyagina N.Y., Peskova N.N., Lermontova S.A. and others Effective delivery of porphyrazine photosensitizers to cancer cells by polymer brush nanocontainers. *J. Biophotonics*, 2016, vol. 10, no. 9, pp. 1189-1197.
10. *Glycerine Producers' Association Physical Properties of Glycerine and Its Solutions.* New York: Glycerine Producers' Association, 1963, 25 p.
11. Пучков Е.О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метболизме. *Биологические мембраны*, 2014. т. 31, № 1, с. 3-13. [Puchkov E.O. Intracellular viscosity: methods of measurement and role in metabolism. *Biologicheskie membrany*, 2014, vol. 31, no. 1, pp. 3-13. (In Russ.)]
12. DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, vol. 233, pp. 351-371.
13. Krasnovskii A.A. Photodynamic activity and singlet oxygen. *Biofizika*, 2004, vol. 49, no. 2. pp. 305-21.

DOSE-DEPENDENT CHANGES OF TUMOR CELL VISCOSITY UNDER PHOTODINAMIC TREATMENT

Soroko S.S.¹, Yudintsev A.V.¹, Kostiuk A.B.¹, Lermontova S.A.^{1,2}, Plekhanov V.I.³, Klapshina L.G.^{1,2}, Balalaeva I.V.¹, Shilyagina N.Yu.¹

¹ Lobachevsky Nizhny Novgorod State University
Gagarin ave., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

² Razuvayev Institute of Organometallic Chemistry of RAS
Tropinin str., 49, Nizhny Novgorod, 603137, Russia

³ Institute of Applied Physics of RAS

Ulyanov str., 46, Nizhny Novgorod, 603155, Russia; e-mail: kastarashan@gmail.com

Abstract. Photodynamic therapy is an intensively developing method of treating oncological diseases based on selective accumulation of a photosensitizer in a tumor and its subsequent local activation with visible light in the presence of oxygen, leading to the formation of free radicals that are toxic to surrounding cells. Currently, the method of photodynamic therapy has a number of unsolved problems, among which we can highlight lack of tool for early assessment of the effectiveness of treatment and the empirical nature of the selection of light irradiation dose. It is known that photodynamically induced cell death is accompanied by a significant increase in intracellular viscosity. One way to assess intracellular viscosity is to use fluorescent molecular rotors – compounds whose quantum yield and fluorescence lifetime strongly depend on the medium viscosity. It has previously been shown that tetrakis(4-fluorophenyl)tetracyanoporphyrazine is a fluorescent molecular rotor and agent for photodynamic therapy. In the present work, we evaluated dose-dependent changes in the viscosity properties of tumor cells under photodynamic treatment with porphyrazine using the time-resolved microscopy method. We have shown that the response of tumor cells to porphyrazine-based photodynamic treatment is dose-dependent that is manifested in the time of onset and in the degree of increase in intracellular viscosity. In turn, the viscosity increase correlates with destructive changes in the cell morphology.

Key words: porphyrazine, photodynamic therapy, molecular rotor, viscosity, FLIM.

О ВОЗМОЖНОЙ ВЗАИМОСВЯЗИ ХИРАЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ХИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР В БИОМАКРОМОЛЕКУЛАХ-МИШЕНЯХ

Семенова Е.В., Малышко Е.В., Твердислов В.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: k.semenova99@gmail.com
Поступила в редакцию: 27.07.2019

Аннотация. Известно, что любой живой организм состоит из значительного количества ассиметричных соединений, и что ассиметричные молекулы могут оказывать избирательное воздействие на другие энантиомеры. Две, на первый взгляд химически идентичные молекулы, могут совершенно по-разному влиять на живой организм. Это особенно важно учитывать при создании лекарственных препаратов, так как стереоизомеры противоположных типов по-разному влияют на организм: одна форма лекарственного средства может оказывать терапевтическое воздействие, тогда как другая вообще не усваиваться, или быть менее активной, и даже вызывать серьезные осложнения, являясь для организма токсичной. В развитие концепции о роли хиральности в структурообразовании биомакромолекул впервые была целенаправленно проанализирована подборка лекарственных средств, выполнена их классификация по следующим критериям: по воздействию на организм, активному изомеру, типу лекарственного препарата и мишени воздействия. Проведенный анализ лекарственных препаратов с позиции хиральности позволил установить, какая из форм лекарственных препаратов чаще оказывает терапевтическое воздействие. Полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы для установления взаимосвязи между хиральной формой лекарственного средства и ее воздействием на конкретную мишень.

Ключевые слова: хиральность, энантиомеры, иерархии структур, белки, ДНК, лекарственные препараты.

Одним из важных свойств некоторых молекул является хиральность – способность объекта не совпадать со своим зеркальным отражением при любых комбинациях перемещений и вращений в трёхмерном пространстве. Два ассиметричных объекта, являющиеся зеркальным отображением друг друга, называются энантиомерами (энантиоморфами). Оптические изомеры обладают идентичными химическими свойствами: они не отличаются друг от друга по таким показателям, как температура кипения, температура плавления, удельный вес и т.п. [1]. Но энантиомеры могут иметь совершенно разную биологическую активность. Любой живой организм состоит из ассиметричных соединений, а именно ассиметричные молекулы могут оказывать избирательное действие по отношению к другим энантиомерам [2]. Поэтому две на первый взгляд химически идентичные молекулы могут совершенно по-разному влиять на живой организм.

Когда ассиметричное вещество проникает в организм, оно вступает во взаимодействие с его ассиметричными молекулами. В этом случае изомер определенного знака хиральности либо усваивается, а его зеркальный двойник отбрасывается, либо организм усваивает оба энантиомера, но реагирует на них по-разному.

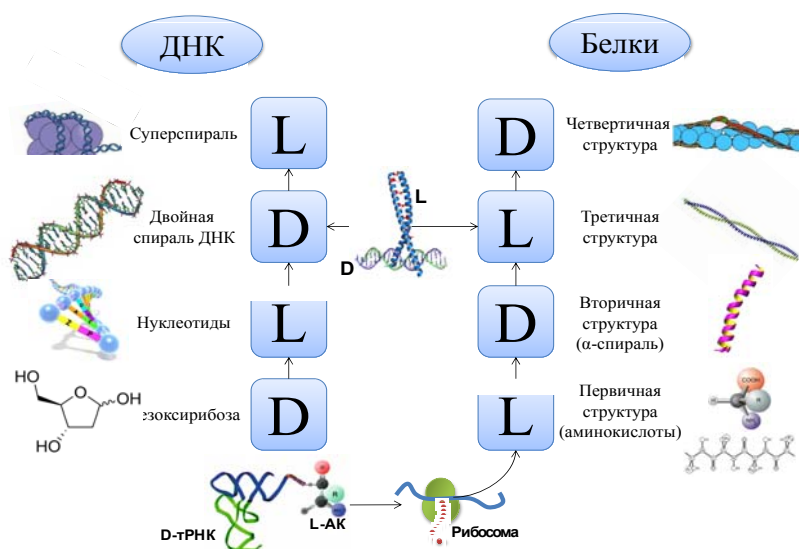


Рисунок 1. Периодическая таблица знакопеременных хиральных иерархий структурных уровней ДНК (левая колонка) и белков (правая колонка): L – левая конфигурация энантиомера, D – правая конфигурация [8]

Среди используемых в настоящее время лекарственных средств больше половины составляют хиральные препараты, а в свою очередь большая часть этих хиральных лекарств представляет собой рацемат [3].

Особенности взаимодействия изомеров с асимметричными соединениями организма важно учитывать при создании лекарственных препаратов, так как может оказаться, что одна форма лекарственного средства обладает терапевтическим эффектом, а другая не усваивается, является менее активной или даже вызывает серьезные осложнения, являясь для организма токсичной.

Получение оптически чистых форм вещества является сложной и дорогостоящей задачей, однако их использование могло бы уменьшить дозировку и количество побочных действий препарата.

В настоящее время физическая природа различий в терапевтическом воздействии энантиомеров не установлена [4]. Ключом к пониманию взаимодействия лекарственного средства с мишенью может являться системная молекулярно-биологическая закономерность: прослеживается тенденция чередования знака хиральности структурных уровней для ДНК и для белков (рис. 1) [5-8].

Первичная структура белка представлена в виде последовательности остатков L-аминокислот [9]. D-аминокислотные остатки, встречающиеся в пептидах, не кодируются при матричном синтезе белка, а синтезируются специальными ферментами. При переходе на второй структурный уровень полипептидная цепь чаще всего укладывается в правую α -спираль или складчатый β -слой. Другие регулярные структуры встречаются гораздо реже. Левых α -спиралей в белках практически нет. То же самое можно сказать и о спиральных 2_7 , 3_{10} . Спиралей π в белках также практически не наблюдается. На уровне третичной структуры, представленной суперспиралью, отмечено преобладание левого знака хиральности. Четвертичная структура белка представляет собой правую спираль: внутриклеточные надмолекулярные структуры, такие как микрофиламенты в мышцах или в кортикальном слое, микротрубочки цитоскелета свиты правым образом из глобулярных белковых молекул. Таким образом, наблюдается чередование знака хиральности L-D-L-D при переходе на более высокий уровень организации белка.

Иерархия ДНК стартует с молекул дезоксирибозы. Эти молекулы, соединенные фосфодиэфирными связями, образуют полимерный остов ДНК и являются D-изомерами. Но включающие их нуклеотиды, формирующие боковые группы полимерной цепи, находятся преимущественно в левой гош-конформации, то есть переход на следующий структурный уровень сопровождается сменой знака хиральности с D на L. Третичная структура представлена двойной спиралью ДНК, которая является правой в A- и B-формах. Последующая сверхспирализация, свойственная полугибким полимерным цепям ДНК, проявляется в левой укладке правых двойных спиралей у эукариот, а также левой укладкой кольцевой ДНК у прокариот. Таким образом, в структурно-функциональной иерархии ДНК также наблюдается смена знака хиральности, но эта последовательность сдвинута на полпериода относительно последовательности для белка и имеет вид D-L-D-L.

В продолжение развития концепции о роли хиральности в структурообразовании биомакромолекул в данной работе впервые была создана подборка лекарственных средств с позиций хиральности, произведена их классификация по следующим критериям:

1. Воздействие L- и D-формы на организм (терапевтическое, токсическое и т.п.).
2. Тип лекарственного средства (антибиотик, противовоспалительное, иммуномодулирующее и т.п.).
3. Мишень воздействия (ДНК, бактерии и т.п.).

КЛАССИФИКАЦИЯ ХИРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Нами составлена подборка из 37 хиральных лекарственных средств и проведена их классификация с позиций хиральности (табл. 1).

Классификация изомеров по их воздействию на организм. L- и D-изомеры рассматриваемых лекарственных препаратов были распределены по трем категориям (рис. 2):

- обладает терапевтическим эффектом
- вызывает побочные действия
- является неактивным или менее активным.

Таблица 1. Рассмотренные хиральные лекарственные средства

1. Адреналин	13. Карведилол	25. Пантопразол
2. Амлодипин	14. Кетамин	26. Пеницилламин
3. Амфетамин	15. Кетопрофен	27. Первитин
4. Анаприлин	16. Кеторолак	28. Рабепразол
5. Аскорбиновая кислота	17. Левомецитин	29. Сарколизин
6. Атенолол	18. Локсиглумид	30. Сибутрамин
7. Атропин	19. Метопролол	31. Соталол
8. Ацетилкарнитин	20. Меторфан	32. Талидомид
9. Варфарин	21. Морфин	33. Тироксин
10. Допамин	22. Напроксен	34. Цетиризин
11. Ибупрофен	23. Омепразол	35. Циталопрам
12. Инсулин	24. Офлоксацин	36. Этамбутол
		37. Этодолак

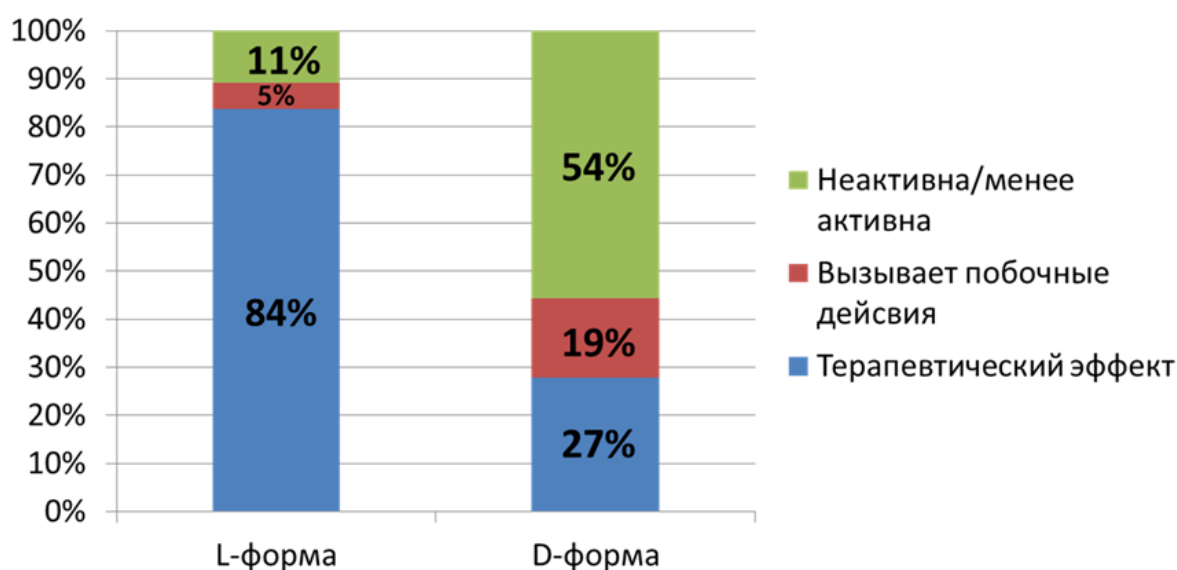


Рисунок 2. Классификация изомеров по их воздействию на организм

Показано, что среди L-форм лекарственных средств терапевтическим эффектом обладает 31 изомер (84% рассматриваемых препаратов). Неактивными или менее активными являются 4 энантиомера (11% рассматриваемых препаратов). Побочные действия вызывают 3 изомера (5% рассматриваемых препаратов).

Для D-форм лекарственных средств верны следующие соотношения: 20 изомеров (54% рассматриваемых препаратов) являются неактивными или менее активными, 10 энантиомеров (27% рассматриваемых препаратов) оказывают терапевтическое действие, 6 изомеров (19% рассматриваемых препаратов) вызывают побочные действия.

Классификация лекарственных препаратов по активному изомеру. Следующая классификация лекарственных препаратов проведена по активному изомеру (рис. 3). Оказалось, что среди 37 препаратов 27 являются «левыми» (70% рассматриваемых препаратов), то есть для них активной является L-форма. «Правых» лекарственных средств, то есть препаратов с активным D-изомером, оказалось гораздо меньше (6, что составляет 19% рассматриваемых препаратов). Оставшиеся 4 препарата (11% рассматриваемых препаратов) имеют два активных изомера, то есть одна форма обладает одним терапевтическим эффектом, вторая форма – другим. Например, декстрометорфан является средством для облегчения кашля, а левометорфан – опиоидным анальгетиком.

Классификация препаратов по типу лекарственного средства. Лекарственные средства, включенные в подборку, также были классифицированы по типу. Была произведена отдельная классификация препаратов с активной L- и D-формой (рис. 4). Среди 27 «левых» лекарств, 8 препаратов (15% «левых» препаратов) являются анальгизирующими средствами, 5 лекарств (10% «левых» препаратов) относятся к типу жаропонижающих/противовоспалительных препаратов, 4 лекарственных средства (8% «левых» препаратов) являются гипотензивными. 3 лекарственных препарата являются антиагрегационными средствами, еще 3 относятся к типу гормональных препаратов, и еще 3 являются антиаритмическими (по 6% «левых» препаратов). Другие типы препаратов представлены гораздо реже.

Для «правых» лекарственных средств данную классификацию произвести не удалось, так как шести препаратам соответствует шесть различных типов лекарств (адреностимулирующее, анорексигенное, антибактериальное, прокинетики, противоязвенное, психостимулирующее средства).

Классификация лекарственных препаратов по мишеням воздействия. Для каждого лекарственного препарата из подборки, рассматриваемой в данной работе, была определена мишень воздействия. Наиболее часто встречающимися мишенями оказались белки, адренорецепторы, бактерии и NMDA-рецепторы (рис. 5).

Среди 11 препаратов, для которых мишенями воздействия являются белки, 9 лекарственных средств являются «левыми», 2 препарата – «правыми». Для 7 препаратов, с адренорецепторами в роли мишеней, справедливы следующие соотношения: у 6 лекарственных средств активной является L-форма и у 1 препарата активной оказалась D-форма. Отмечено 3 препарата, для которых мишенями воздействия являются бактерии, 2 из которых являются «левыми» лекарственными средствами, а 1 препарат является «правым». Соотношения для лекарственных средств, у которых мишенями являются NMDA-рецепторы, аналогичны соотношениям, полученным для препаратов с бактериями в роли мишеней воздействия (рис. 6).

Терапевтический эффект

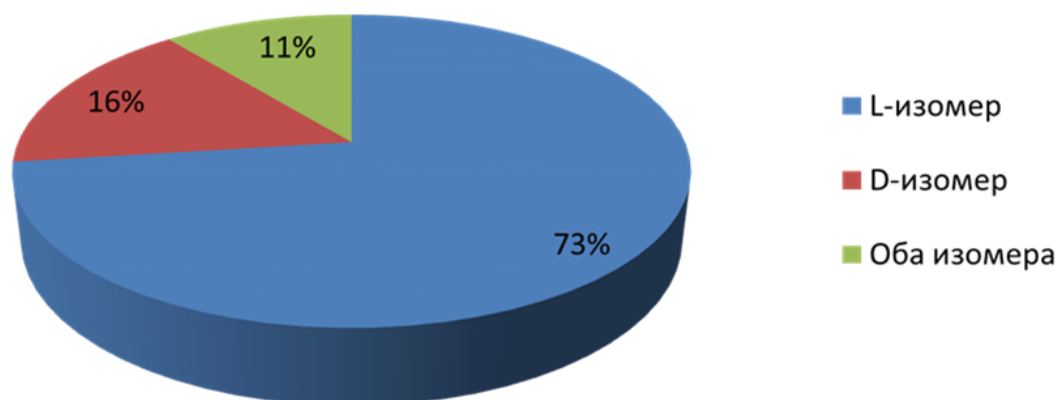


Рисунок 3. Классификация лекарственных препаратов по активному изомеру

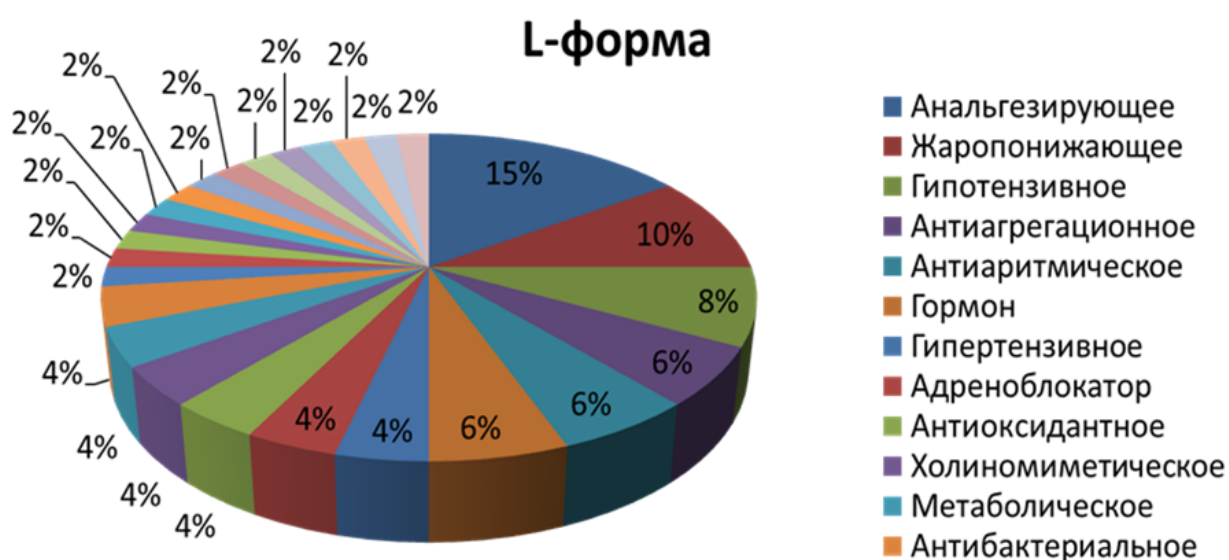


Рисунок 4. Классификация препаратов с активной L-формой по типу лекарственного средства

Мишени

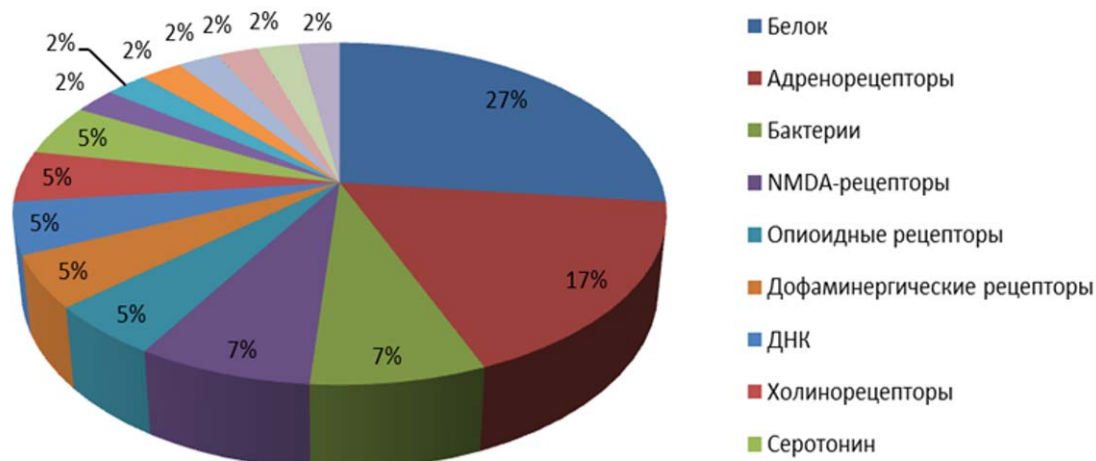


Рисунок 5. Классификация лекарственных препаратов по мишеням воздействия

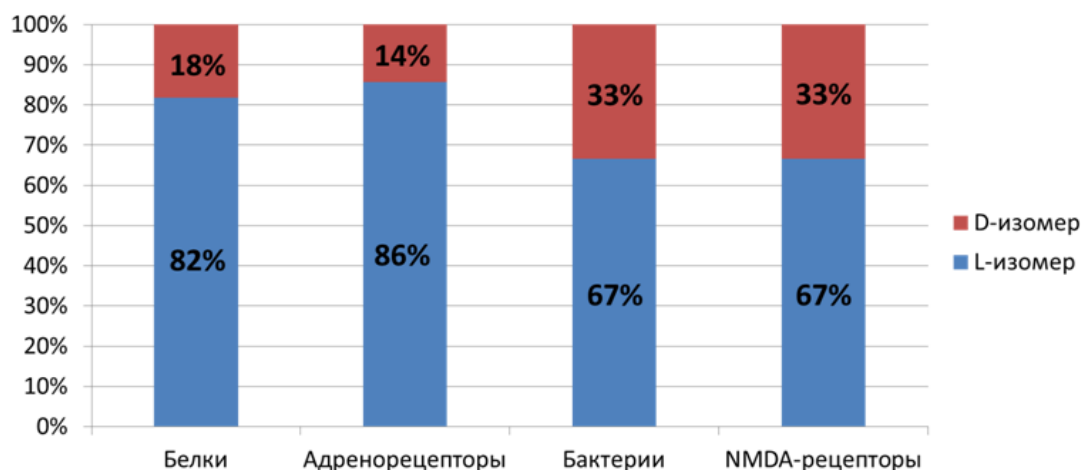


Рисунок 6. Классификация лекарственных препаратов, у которых мишенями воздействия являются белки, адренорецепторы, бактерии и NMDA-рецепторы

В настоящей работе установлено, что большинство L-форм лекарственных средств обладает терапевтическим эффектом, а большинство D-форм препаратов является неактивными или менее активными изомерами. Показано, что среди вызывающих побочные действия изомеров чаще встречаются D-формы лекарственных средств. Лекарственные препараты с активными L-изомерами чаще являются анальгезирующими, жаропонижающими/противовоспалительными и гипотензивными средствами. Кроме того, отмечено, что белки, адренорецепторы, бактерии и NMDA-рецепторы чаще являются мишенями воздействия для лекарственных препаратов с активной L-формой.

Проведенный нами анализ некоторой выборки лекарственных препаратов с позиции хиральности позволил установить, какая из форм лекарственных препаратов чаще оказывает терапевтическое воздействие. Полученные результаты в дальнейшем могут быть использованы для высказывания предположения о возможных механизмах такого специфического воздействия и установления взаимосвязи между хиральной формой лекарственного средства и ее воздействием на конкретные мишени.

Список литературы / References:

1. Василенко И.А. и др. Оптические изомеры в фармацевтике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 2015, вып. 1, с. 92-104. [Vasilenko I.A. et al. Optical isomers in the pharmaceutic. *Drug development & registration*, 2015, iss. 1, pp. 92-104. (In Russ.)]
2. Гарднер М. *Этот правый, левый мир*. М.: МИР, 1967, 265 с. [Gardner M. *The Ambidextrous Universe*. М.: MIR, 1967, 265 p. (In Russ.)]
3. Leffingwell J.C. Chirality & bioactivity I: pharmacology. *Leffingwell Reports*, 2003, vol. 3, no. 1, pp. 1-27.
4. Храмова, Е.А. *Фотоиндуцированные процессы переноса заряда в хиральных связанных системах*. Дис. канд. хим. наук: 02.00.04. Новосибирск, 2016. 103 с. [Khramtsova E.A. *Photoinduced charge transfer processes in chiral coupled systems*. PhD thesis: 02.00.04, Novosibirsk, 2016, 103 p. (In Russ.)]
5. Твердислов В.А. и др. От симметрий – к законам эволюции. I. Хиральность как инструмент стратификации активных сред. *Биофизика*, 2012, т. 57, вып. 1, с. 146-154. [Tverdislov V.A. et al. From Symmetries to the Laws of Evolution. I. Chirality as a Means of Active Media Stratification. *Biophysics*, 2012, vol. 57, iss. 1, pp. 146-154. (In Russ.)]
6. Твердислов В.А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах. *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 1, с. 159-164. [Tverdislov V. A. Chirality as a Primary Switch of Hierarchical Levels in Molecular Biological Systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, iss. 1, pp. 159-164. (In Russ.)]
7. Твердислов В.А. [и др.] От автоволновых механизмов самоорганизации к молекулярным машинам. *Известия РАН. Сер. физическая*, 2015, т. 79, № 12, с. 1728-1732. [Tverdislov V.A. [et al.] From autowave mechanisms of self-organization to biological machines. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Physics*, 2015, vol. 79, no. 12, pp. 1728-1732. (In Russ.)]
8. Твердислов В.А. [и др.] Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. *Биофизика*, 2017, т. 62, вып. 36 с. 421-434. [Tverdislov V.A. [et al.] Periodic System of Chiral Structures in Molecular Biology. *Biophysics*, 2017, vol. 62, iss. 3, pp. 421-434. (In Russ.)]
9. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами*. М.: КДУ, 2012, 456 с. [Finkelstein A.V., ptitsyn O.B. *Protein Physics: A Course of Lectures*. М.: KDU, 2012, 456 p. (In Russ.)]

ON THE POSSIBLE INTERRELATION OF THE CHIRALITY OF DRUGS AND CHIRAL STRUCTURES IN TARGET BIOMACROMOLECULES**Semenova E.V., Malyshko E.V., Tverdislov V.A.**

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory str., 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: k.semenova99@gmail.com

Abstract. It is known that any living organism consists of a significant amount of asymmetric compounds, and that asymmetric molecules can have a selective effect on other enantiomers. Two seemingly chemically identical molecules may have quite different effect on a living organism. This is especially important to consider when creating medicines, since stereoisomers of opposite types have different effects on the body: one form of drug can have a therapeutic effect, while the other form may not be assimilated at all, or be less active, and even cause serious complications, being toxic to the body. In the development of the concept of the role of chirality in the structure of biomacromolecules, for the first time a selection of drugs has been purposefully analyzed, classified according to the following criteria: the impact on the body, active isomer, type of drug and target impact. The analysis of drugs from the standpoint of chirality allowed us to determine which form of drugs has a therapeutic effect more often. The obtained results can be further used to establish the relationship between the chiral form of the drug and its effect on a specific target.

Key words: *chirality, enantiomers, hierarchy of structures, proteins, DNA, drugs.*

АВТОМАТИЧЕСКИЙ ДАТЧИК ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА БАЗЕ ARDUINO NANO

Чекушкин А.А.¹, Гаврилов П.Е.², Лелеков А.С.¹

¹ ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: chekushkin.78@mail.ru

² Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. Предложен автоматический датчик измерения оптической плотности культуры микроводорослей на базе платформы Arduino Nano. Выбор данного микроконтроллера обусловлен его широкой доступностью, наличием свободного программного обеспечения, низкой стоимостью. Анализ литературных данных показал, что при разработке подобных датчиков обычно используется проточная кювета, в качестве источника света используются различные светодиоды. Использование приведённых в литературе датчиков невозможно, так как авторами не указываются монтажные схемы подключения элементов к микроконтроллеру, программная среда, на которой написан алгоритм сбора данных и т. д. В данной работе поставлена задача предложить схему разработки датчика оптической плотности из стандартных широкодоступных комплектующих. Например, в данной работе использовался зелёный светодиод с максимумом светимости на длине волны 520 нм, в качестве фотоприёмника – фоторезистор GL12516. При калибровке использовали культуру цианопрокариоты *Spirulina platensis*. Получены кривые зависимости коэффициента пропускания и поглощения от сухой биомассы *S. platensis*. Показано, что в диапазоне плотностей культуры от 0,07 до 1,38 г СВ/л данные с высокой степенью точности ($R^2 = 0,99$) описываются уравнением Бугера-Ламберта-Бера. Выполнена апробация датчика при культивировании *S. platensis* в плоскопараллельных фотобиореакторах различной толщины.

Ключевые слова: датчик оптической плотности, *Spirulina platensis*, коэффициент поглощения, моделирование, плоскопараллельный фотобиореактор.

ВВЕДЕНИЕ

Оптический метод контроля роста культуры микроводорослей является наиболее простым в применении и широко распространен среди исследователей. К достоинствам данного метода следует отнести возможность непрерывного наблюдения за ростом культуры посредством автоматических датчиков оптической плотности. На сегодняшний день разработано множество подобных устройств. Так, например, в [1] предложена конструкция датчика оптической плотности, состоящего из светодиода с максимумом светимости 880 нм и пары фотодиодов, установленных на противоположной стороне проточной кюветы диаметром 10 мм. Датчик позволяет оценить сухой вес культуры зелёных водорослей *Nannochloropsis oceanic* до 2,0 г·л⁻¹. В работе [2] разработан автоматизированный проточный датчик плотности для системы сбора урожая при промышленном выращивании *Nannochloropsis* sp. Светодиоды в паре с фотодатчиками использовались для измерения светопропускания суспензии микроводорослей при 470, 518, 630 и 940 нм. Для оценки концентрации биомассы путём сопоставления показаний напряжения каждого фотодатчика с концентрацией клеток, измеренной по количеству клеток, была использована нейронная сеть. Максимальная ошибка измерений в интервале от 5 до 145·10⁶ кл. мл⁻¹ не превышала 9%. В работе [3] описано непрерывное наблюдение за изменением концентрации хлорофилла и плотности цианобактериальной суспензии. Для определения фикобилипротеинов использовали синие 455 нм и оранжевые светодиоды 627 нм. Оптическая плотность суспензии измерялась на 680 нм и 735 нм. Количество клеток и концентрация хлорофилла были пропорциональны оптической плотности культуры на длине волны 680 нм в диапазоне 0,1-1,2 г СВ·л⁻¹. В [4] предложена биореакторная система для культивирования *Synechocystis* sp. Сухую массу микроводорослей оценивали путем измерения оптической плотности суспензии при 870 нм. В [5] разработан датчик оптической плотности, который позволил состоянием оценить концентрацию биомассы в диапазоне от 0,05 г СВ·л⁻¹ до 0,5 г СВ·л⁻¹. Авторы акцентировали внимание, что работе датчика в условиях естественного освещения наблюдались значительные отклонения от полученных калибровочных кривых, обусловленные влиянием температуры на сенсорный блок.

Таким образом, несмотря на однотипность конструкции, любой из предложенных датчиков оптической плотности имеет следующие недостатки: 1. Датчики разрабатываются под задачи конкретного исследователя или под какую-либо конструкцию фотобиореактора; 2. Калибровочные кривые, представленные в указанных работах, выполнены для исследуемых видов микроводорослей и в определённом диапазоне плотностей; 3. Авторами не приводятся монтажные схемы подключения элементов датчика к микроконтроллеру, не указывается программная среда, на которой написан алгоритм сбора данных и т. д. В данной работе сделана попытка разработки датчика оптической плотности культуры микроводорослей, который бы удовлетворял следующим требованиям: 1. Простота, надёжность, минимальная стоимость конструкции; 2. Все составные части должны быть стандартного фабричного производства; 3. Все составные элементы системы разработаны

на основе теоретических представлений о росте микроводорослей в культуре [6]. Поставленная задача является логическим продолжением наших предыдущих исследований по разработке унифицированной установки для исследования роста микроводорослей [7], с последующим её оснащением автоматическими системами сбора информации [8].

В качестве устройства сбора и обработки информации была выбрана платформа Arduino Nano, построенная на микроконтроллере ATmega168. К достоинством данного устройства следует отнести имеет небольшие размеры, малую стоимость, возможность использования в научных исследованиях, а также открытое программное обеспечение Arduino (<http://arduino.cc>). Микроконтроллер ATmega168 поставляется с записанным загрузчиком, облегчающим компиляцию новых программ без использования внешних программаторов.

Целью данной работы являлась разработка, сборка и калибровка автоматического датчика оптической плотности культуры микроводорослей на базе Arduino Nano.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского», а также на базе кафедры «Физика» ФГАОУ «Севастопольский государственный университет». Объектом исследования являлась цианобактерия *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont из коллекции ФИЦ ИнБЮМ. Культура выращивалась в унифицированной лабораторной установке [7] на питательной среде Заррук [9] в лабораторных фотобиореакторах плоскопараллельного типа толщиной 2 см и 3 см при круглосуточном искусственном освещении лампами дневного света General Electric F18W/54-765. Средняя освещённость на поверхности фотобиореакторов составляла 5 клк. Барботаж культур осуществляли аквариумным компрессором, скорость подачи воздуха составляла 1 л/л культуры в минуту. Фотобиореакторы были оснащены системой охлаждения, температура поддерживалась на постоянном уровне 28 – 30 °C.

В эксперименте проводили измерение температуры, освещённости, сырого и сухого веса (СВ). Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в фотобиореакторе, абсолютная погрешность измерений составляла 0,5 °C. Освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116 ПО «Вибратор» (СССР). Спектр излучения светодиода измеряли на спектрофотометре СФ-2000. Сырой и сухой вес определяли на лабораторных электронных весах L220S (200 г) 2го класса точности, погрешность измерения составляла 0,001 г. Напряжение на светодиоде и фоторезисторе измеряли с помощью цифрового мультиметра Mastech M832. Обработку экспериментальных данных осуществляли в Libre Office и Scidavis. Воздушно сухую биомассу *S. platensis* получали из пасты в сушильном шкафу при 40 °C в течение суток.

Основным элементом датчика оптической плотности являлась платформа Arduino Nano (рис. 1), которая может получать питание через USB-подключение или от регулируемого 6 – 20 В внешнего источника. В нашей схеме использовался импульсный понижающий регулируемый стабилизатор постоянного напряжения DC-DC LM2596. В качестве источника питания использовали стандартное зарядное устройство для мобильного телефона, выходное напряжение которого составляет 5 В. Запись данных, полученных с аналоговых выходов, осуществлялась в текстовый файл на 2 Gb SD-карту памяти, которая подключалась с помощью модуля MicroSD Card к контактам платы: CS к D4, SCK к D13, MOSI к D11, MISO к D12.

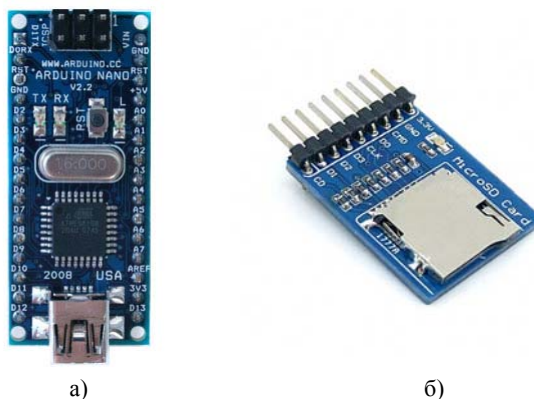


Рисунок 1. Платформа Arduino Nano. (а) – внешний вид; (б) – Модуль MicroSD Card

КОНСТРУКЦИЯ ДАТЧИКА ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ

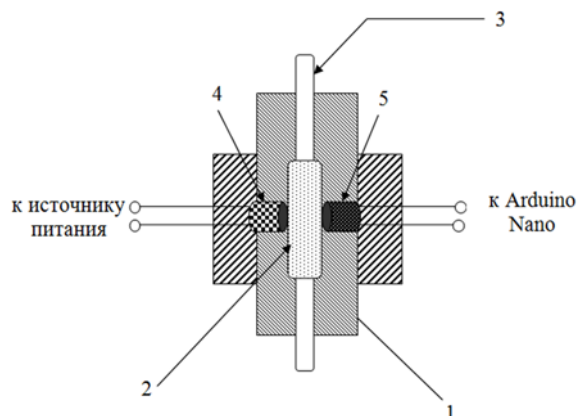


Рисунок 2. Схема датчика оптической плотности (вид сбоку). 1 – корпус датчика, 2 – кювета 1 см, 3 – силиконовая трубка, 4 – зеленый светодиод, 5 – фоторезистор

На рисунке 2 представлены основные элементы датчика оптической плотности. Корпус 1 выполнен из напечатанного на 3D принтере ANET A6 из ABS пластика черного цвета, имеющего форму параллелепипеда размерами $50 \times 10 \times 10$ мм. Чёрный цвет корпуса 1 обеспечивает непроницаемость датчика для внешнего света. В поперечное отверстие вставлена силиконовая трубка 3 диаметром 5 мм, которая обеспечивает проток суспензии клеток водорослей через датчик. Концы трубки 3, выступающие за корпус датчика 1, также окрашены в чёрный цвет с целью нивелирования влияния внешней освещённости на показания прибора. В продольное отверстие корпуса с противоположных сторон встроен светодиод 4 и фоторезистор 5 таким образом, чтобы силиконовая трубка 3 и кювета 2 находились между ними.

Поглощение света суспензией микроводорослей на разных длинах волн связано с различным пигментным составом клеток. Например, у *S. platensis* основной фотосинтетический пигмент хлорофилл а имеет два пика в синей и красной области спектра на 430 нм и 660 нм, каротиноиды – 440 нм, С-фикоцианин – 620 нм, реакционный центр P700 – 700 нм [10]. Поэтому для измерения поглощения биомассы в целом необходимо выбрать такую длину волны, на которой поглощение пигментов не является определяющим – дальняя красная (730 – 750 нм) либо зелёная (520 нм) область спектра. В качестве светодиода нами выбран зелёный светодиод с максимумом светимости при 520 нм (рис. 3).

В качестве приёмника света использовали фоторезистор GL5539, имеющий диапазон чувствительности в области от 400 до 850 нм с максимумом, приходящимся на 540 нм. Стоит отметить, что вместо указанного фоторезистора возможно использование любого фоторезистора с аналогичными параметрами. На рисунке 4 представлен внешний вид, спектральная чувствительность и зависимость сопротивления резистора от температуры.

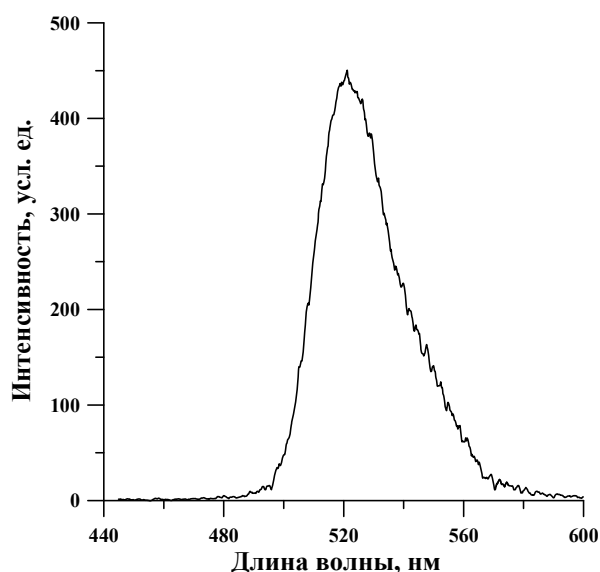


Рисунок 3. Спектр излучения зелёного светодиода

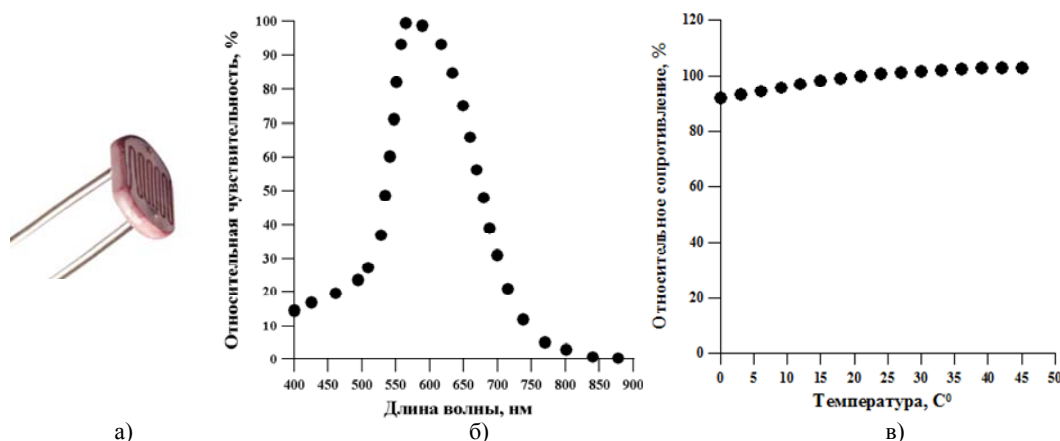


Рисунок 4. Фоторезистор GL12516 12 мм (а) – внешний вид; (б) – спектральная характеристика; (в) – зависимость сопротивления от температуры [11]

КАЛИБРОВКА ДАТЧИКА ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ

Экспериментально определено, что напряжение, выводимое на мониторе порта компьютера в программной среде Arduino и на Micro CD CARD, разное (рис. 5). Для удобства использования датчика был определён коэффициент перехода между показаниями на мониторе порта и Micro CD CARD. Полученная зависимость описывается линейной регрессией ($R^2 = 0,99$), тангенс угла наклона равен 1,37.

Для калибровки датчика использовали культуру *S. platensis*, которую выращивали в течение 5 суток в накопительном режиме. Профильтровав суспензию, получили сырую биомассу, которую развели в 1 л среды Заррук. Полученный маточный раствор с плотностью культуры $1,38 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$ разбавляли и проводили измерения напряжения на фоторезисторе. Результаты представлены в таблице 1. В качестве "нулевой" точки использовали питательную среду Заррук, при этом напряжение на фоторезисторе составило $U_0 = 1,9 \text{ В}$. Светимость светодиода зависит от напряжения питания. Экспериментально было подобрано напряжение питания светодиода 2,25 В, при котором датчик позволял проводить измерения как разбавленной, так и оптически плотной культуры *S. platensis*. Коэффициент пропускания T определяли по формуле:

$$T = \frac{U}{U_0}.$$

Коэффициент поглощения α определяли по формуле:

$$\alpha = \frac{U_0 - U}{U_0} = 1 - T.$$

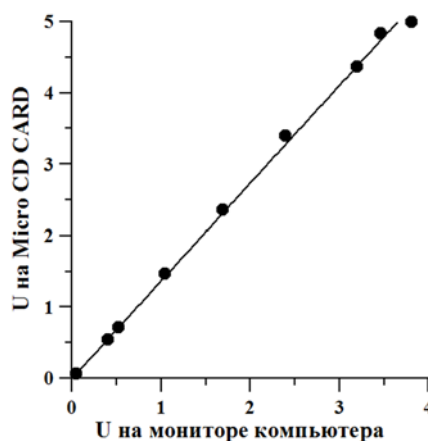


Рисунок 5. Зависимость напряжения на Micro CD CARD от напряжения на мониторе порта в программной среде Arduino. Линия – аппроксимация экспериментальных данных описывается линейным сплайном, тангенс угла наклона равен 1,37

Таблица 1. Экспериментальные данные калибровки датчика оптической плотности

Коэффициент разбавления	Биомасса, г СВ/л	Напряжение на фоторезисторе, U, В	U ₀ , В	Коэффициент пропускания, T	Коэффициент поглощения, α
1	1,38	0	1,9	0	1
1,5	0,92	0,085		0,04	0,95
2	0,69	0,19		0,1	0,9
3	0,46	0,52		0,27	0,72
4	0,35	0,64		0,33	0,66
5	0,28	0,84		0,44	0,55
6	0,23	1		0,52	0,47
7	0,2	1,03		0,54	0,45
8	0,17	1,2		0,63	0,36
10	0,14	1,32		0,69	0,3
13	0,11	1,44		0,75	0,24
21	0,07	1,6		0,84	0,15

На рисунке 6 представлена зависимость коэффициента поглощения α и пропускания T от биомассы *S. platensis*. Экспериментальные данные в диапазоне плотностей культуры от 0,07 до 1,38 г СВ/л с высокой степенью точности ($R^2 = 0,99$) описываются законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$\alpha = 1 - e^{-k \cdot B},$$

где k – коэффициент пропорциональности, зависящий от толщины кюветы и коэффициента экстинкции.

Полученные результаты позволяют использовать линейную зависимость между оптической плотностью культуры на датчике и биомассой микроводорослей. Оптическая плотность D , по определению, есть десятичный логарифм коэффициента пропускания. На рисунке 7 представлена зависимость биомассы от оптической плотности культуры *S. platensis*. Для используемой в датчике 1 см кюветы коэффициент пропорциональности составил 0,71.

АППРОБАЦИЯ ДАТЧИКА ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ПРИ НАКОПИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *S. PLATENSIS*

Ключевым фактором, влияющим на фотобиосинтез микроводорослей, является свет. Поверхностная освещённость, в совокупности с условиями перемешивания и формой освещаемой поверхности, определяет скорости синтеза тех или иных биохимических составляющих клеток, а также скорость роста культуры в целом, характер накопительной кривой роста [12]. Обычно при культивировании микроводорослей в плоскопараллельных системах накопительная культура характеризуется наличием линейного участка (линейная фаза роста) [13]. Механизм явления линейного роста описан только для бактериальных культур [14]. Для культур микроводорослей линейный рост может быть связан с газовым обеспечением [6], либо как показано в работе [12] со светолимитированием

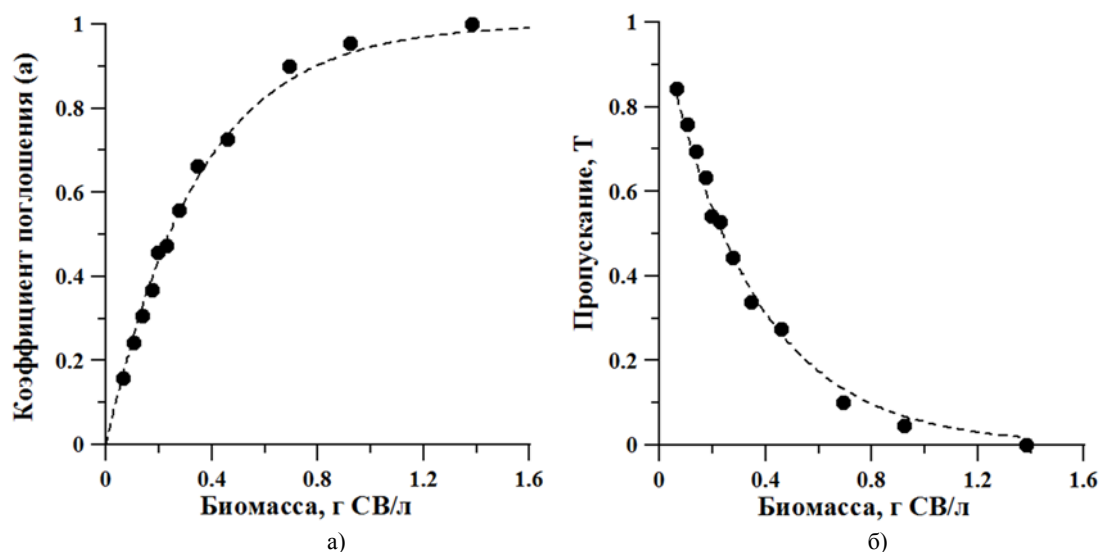


Рисунок 6. Зависимость коэффициента поглощения (а) и коэффициента пропускания T (б) от биомассы *S. platensis*. Пунктирная линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением Бугера-Ламберта-Бера, $k=2,9$

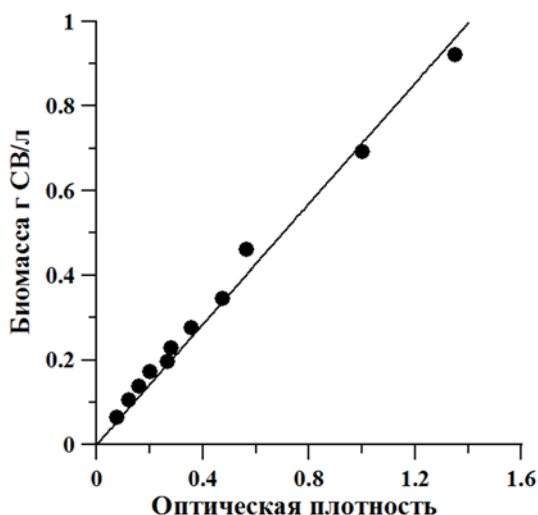


Рисунок 7. Корреляционная зависимость биомассы от оптической плотности. Линия – аппроксимация экспериментальных данных описывается линейным уравнением, тангенс угла наклона равен 0,71

Независимо от механизма, обеспечивающего линейный рост, постоянство скорости роста позволяет относительно простыми способами управлять биохимическим составом получаемой биомассы в довольно широком диапазоне. Это свойство очень удобно в практическом плане, т. к. без потери продуктивности можно выбрать такую плотность непрерывной культуры, при которой на выходе будет получена биомасса с заданным биохимическим составом.

Исследования линейного роста *S. platensis* проводили с использованием предложенного в данной работе автоматического датчика оптической плотности. На рисунке 8 представлены накопительные кривые для 2 и 3 см фотобиореактора. Временной интервал между двумя последующими измерениями составлял 10 минут. На третьи – пятые сутки эксперимента отмечено значительный разброс экспериментальных данных, что обусловлено обрастанием кюветы датчика водорослями. В 3 см фотобиореакторе на 7 сутки отмечено резкое увеличение скорости роста культуры *S. platensis*, что также связано с обрастанием. Следовательно, при работе с датчиком необходимо промывка измерительной кюветы не реже чем раз в 2-3 дня.

Были определены кинетические параметры роста культуры *S. platensis*: максимальная плотность и продуктивность. Результаты представлены в таблице 2. Максимальная продуктивность была рассчитана аппроксимацией линейного участка накопительной кривой уравнением:

$$B = B_0 + P_m \cdot t,$$

где B_0 – начальное значение биомассы, P_m – максимальная продуктивность культуры.

Полученные результаты свидетельствуют о двукратном росте максимальной продуктивности *S. platensis* при уменьшении слоя культуры на 1 см. Полученные данные могут быть использованы при расчётах среднепространственной облучённости и её влияния на рост оптически плотных культур микроводорослей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день любые исследования микроводорослевых культур оптическим методом предполагают отбор пробы из культиватора с их последующим спектрофотометрированием. При этом часто интервал между отбором пробы и измерением на приборе составляет десятки минут, а то и часы. За такой промежуток времени в клетках могут происходить значительные изменения биохимического состава [6]. Кроме того, сам процесс отбора пробы из культиватора носит субъективный характер: агглютинация клеток микроводорослей, их оседание на стенках фотореактора и т. д. могут вносить значительные ошибки. Также по сложившейся в альгологии традиции измерения проводятся в лучшем случае 1-2 раза в сутки, при этом скорости роста микроводорослей могут достигать $0,3-0,4 \text{ ч}^{-1}$, т. е. время генерации составляет часы [15]. Вызывает множество вопросов применение стандартных спектрофотометров, у которых луч идёт перпендикулярно измерительной кювете: из-за оседания клеток в кювете результаты измерения оптической плотности могут оказаться сильно заниженными.

Таблица 2. Экспериментальные данные максимальной скорости роста и максимальной продуктивности культуры *S. platensis* для 2 см и 3 см культиватора

Толщина культиватора	P_m , г СВ/л·час	P_m , г СВ/л·сут	B_m , г СВ/л
2 см	0,01	0,24	1,5
3 см	0,005	0,12	1,6

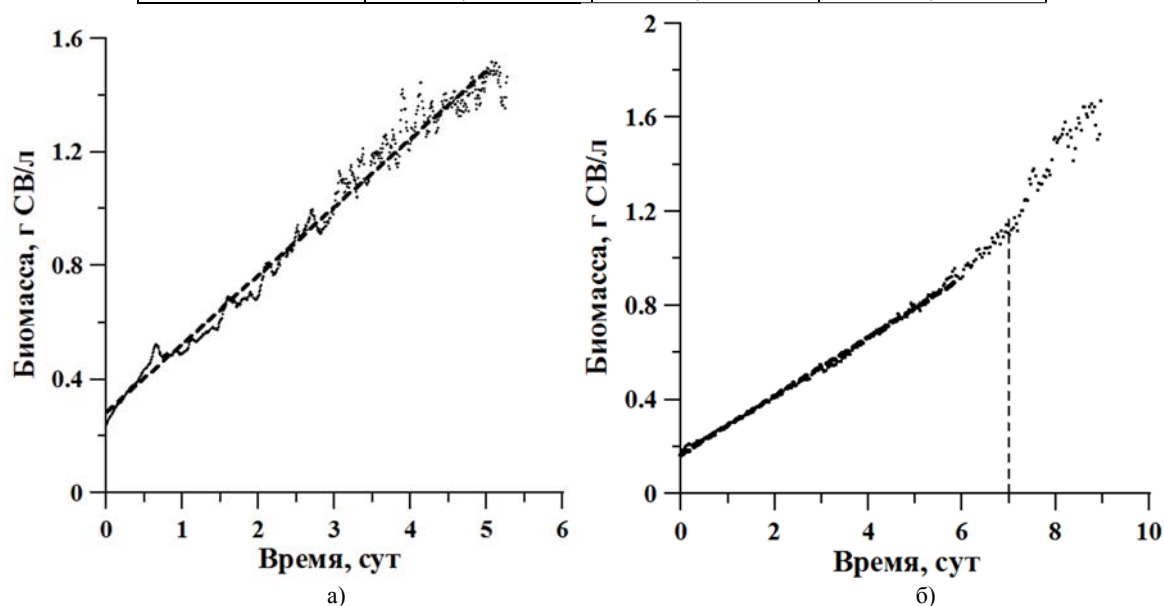


Рисунок 8. Зависимость биомассы *S. platensis* от времени в 2 (а) и 3 см (б) культиваторе. Линия – аппроксимация экспериментальных данных линейным уравнением, максимальная продуктивность $P_m = 0,24$ г СВ/л·сут и 0,12 г СВ/л·сут соответственно

Указанные недостатки оптического способа контроля за ростом микроводорослей можно исключить, используя автоматические проточные системы. Предложенный в данной работе автоматический датчик оптической плотности позволяет определять биомассу микроводорослей в режиме реального времени с любым требуемым интервалом, не требует (кроме технического обслуживания) вмешательства исследователя в процессы роста культуры, исключает оседание клеток благодаря проточной кювете. Данная работа может служить некоторым шаблоном для последующих разработок в области автоматизации водорослевых исследований. В работе указаны ключевые моменты, на которые необходимо обратить внимание: 1. Типовая конструкция проточной кюветы и использование стандартных фабричных комплектующих позволяет значительно снизить стоимость конечного изделия и упростить его эксплуатацию; 2. При выборе источника света и фотоприёмника следует обращать внимание на их спектральные и температурные характеристики; 3. При калибровке датчика оптической плотности необходимо указывать область рабочей плотности, так как известно, что могут наблюдаться значительные отклонения экспериментальных данных от уравнения Бугера-Ламберта-Бера [16].

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 0828-2019-0004.

Список литературы / References:

1. Sandnes J.M., Ringstad T., Wenner D., Heyerdahl P.H., Källqvist T., Gislerød H.R. Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. *J. Biotech.*, 2006, vol. 122, pp. 209-215. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.08.034.
2. Briassoulis D., Panagakis P., Chionidis M., Tzenos D., Lalos A., Tsinos C., Berberidis K., Jacobsen A. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresour. Technol.*, 2010, vol. 101, pp. 6768-6777. DOI: 10.1007/s00253-015-6876-7.
3. Nedbal L., Trtílek M., Červený J., Komárek O., Pakrasi H.B. A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics. *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, vol. 100, pp. 902-910.
4. Marxen K., Vanselow K., Lippemeier S., Hintze R., Ruser A., Hansen U. A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 2005, vol. 17, pp. 535-549.
5. Yao Y., Thommasson J.A., Ge Y., Sui R. Improvement of an optical density sensor for algae pond monitoring and process control. *ASABE*, 2012. DOI:10.13031/2013.42323.
6. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей в культуре*. Белгород: ООО "Константа", 2017, 152 с. DOI: 10.21072/978-5-906952-28-8. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modelling of microalgae growth in culture*. Belgorod: Konstanta, 2017, 152 p. (In Russ.)]

7. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1, вып. 13. URL: <http://algology.ru/1097> [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified installation for laboratory studies of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1, iss. 13. URL: <http://algology.ru/1097>. (In Russ.)]
8. Гаврилов П.Е., Азаров А.А., Лелеков А.С. Проточный датчик для определения оптической плотности культуры микроводорослей. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, т. 1, с. 101-105. [Gavrilov P.E., Azarov A.A., Lelekov A.S. Flow sensor for determining the optical density of a microalgae culture, *Actual problems of biological physics and chemistry*, 2016, vol. 1, pp. 101-105. (In Russ.)]
9. Zartouck C. *Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima*. Ph.D. thesis, Paris, 1966, 138 p.
10. Хол Д., ПАО К. *Фотосинтез: пер. с англ.* М.: Мир, 1983, 134 с. [Hol D., Rao K. *Photosynthesis: trans. from english*. M.: Mir, 1983, 134 p. (In Russ.)]
11. *CdS Photoresistor Manual. GL125 Series Photoresistor*. URL: <https://opencircuit.nl/ProductInfo/1000662/GL12528-Datasheet.pdf>.
12. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 1, с. 53-60. DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06 [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Novikova T.M. Linear growth of marine microalgae in culture. *Marine Biological Journal*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 53-60. (In Russ.)]
13. Naumann T., Çebi Z., Podola B., Melkonian M. Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, 2013, vol. 25, pp. 1413-1420. DOI 10.1007/s10811-012-9962-6.
14. Марьин В.А., Харитонов Д.В. Линейный рост и пассивация активных клеток растущей культуры микроорганизмов. *Техника и технология пищевых производств*, 2014, № 4, с. 97-106. [Mar'in V.A., Haritonov D.V. Linear growth and passivation of active cells of a growing culture of microorganisms. *Technique and technology of food production*, 2014, no. 4, pp. 97-106. (In Russ.)]
15. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. *Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей*. Новосибирск: Наука, 1980, 136 с. [Belyanin V.N., Sid'ko F.YA., Trenkenshu A.P. *Energy photosynthetic culture of microalgae*. Novosibirsk: Nauka, 1980, 136 p. (In Russ.)]
16. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Гаврилов П.Е., Набойщиков В.С. Математическая модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, т. 1, с. 77-82. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Gavrilov P.E., Nabojshchikov V.S. Mathematical model of the dependence of the optical density of the culture on the biomass of microalgae. *Actual problems of biological physics and chemistry*, 2016, vol. 1, p. 77-82. (In Russ.)]

AUTOMATIC OPTICAL DENSITY SENSOR OF MICROALGAE CULTURE ON THE ARDUINO NANO BASIS

Chekushkin A.A.¹, Gavrilov P.E.¹, Lelekov A.S.¹

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS,
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: chekushkin.78@mail.ru

² Sevastopol State University
Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: havrilovpyotr@gmail.com

Abstract. An automatic sensor for measuring the optical density of microalgae culture on the Arduino Nano basis is proposed. The choice of this microcontroller is due to its wide availability, availability of free software, low cost. It is shown that in the development of such sensors a flow cell is applied, various LEDs are used as a light source. The use of the sensors given in the literature is impossible since the authors do not specify the wiring diagrams of the sensor elements, the software environment on which the algorithm of data collection is written, etc. In this work, the task is to offer a scheme for the development of an optical density sensor from standard widely available components. For example, the proposed sensor used a green led with a maximum luminosity at a wavelength of 520 nm, as a photodetector – photoresistor GL12516. During calibration of the sensor used culture of the cyanoprokaryota *Spirulina platensis*. The curves of the transmittance and absorption dependence on the dry biomass of *S. platensis* are obtained. It is shown that in the range of culture densities from 0.07 to 1.38 g DW/l the data with a high degree of accuracy ($R^2 = 0.99$) are described by the Booger-Lambert-Ber equation. Performed testing of the sensor during the cultivation of *S. platensis* in a plane-parallel photobioreactors of varying thickness.

Key words: optical density sensor, *Spirulina platensis*, absorption coefficient, modelling, plane parallel photobioreactor.

ДЕТЕРМИНИРОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА КАК ПЕРКОЛЯЦИОННОЙ РЕШЕТКИ

Гараева А.Я., А.Э. Сидорова, В.А. Твердислов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: sky314bone@mail.ru

Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. Системно изложена роль естественного отбора в биологической эволюции, отражающая современные биологические концепции. Предложен и разработан новый подход к теоретическому обобщению и математическому описанию этой ключевой проблемы биологии, основанный на представлениях о физическом явлении «протекания». Естественный отбор оптимальных вариантов в эволюционном потоке мутаций рассмотрен в качестве перколяционного фильтра – физического инструмента, составляющего механизм отбора. Показано, что при отсутствии дрейфа процесс закрепления мутаций определяется только детерминированными механизмами отбора, т.е. наличием в популяции поддерживающих и запрещающих мутаций и их взаимодействием с новыми мутациями.

Ключевые слова: естественный отбор, самоорганизация, флуктуации, бифуркации, перколяции, мутации.

Естественный отбор в процессе эволюции Жизни на Земле – особая форма когерентного поведения элементов сложной системы, где критерием отбора служит развитие системы при изменении ее структуры. В ходе отбора, как правило, усиливается роль генетических и снижается значимость внешних регуляторов онтогенеза. Это определяет способность популяции как сложной системы к самоорганизации под воздействием внешних возмущений и внутренних флуктуаций [1]. Комбинаторный источник изменчивости практически неисчерпаем, но ограничен надежными структурными элементами генетической системы и совокупностью взаимодействующих мутаций [2]. Поэтому организмы способны реализовать лишь небольшую часть теоретически допустимых траекторий развития, что делает биологическую эволюцию достаточно прогнозируемым и детерминированным процессом (в границах процессов самоорганизации). В процессе закрепления мутаций работает блочный принцип эволюции, потому что эффект новых мутаций зависит от спектра предыдущих мутаций (геномы не способны адаптивно эволюционировать сразу по многим генам [3]). Последовательность закрепления мутаций определяет «вектор отбора», т.е. обратимость или необратимость процессов эволюции после очередной точки бифуркации. С физической точки зрения это кинетическая необратимость, свойственная перколяционным системам.

В физике перколяции – это явление протекания жидкостей через пористые материалы, при котором существует хотя бы один непрерывный путь через соседние проводящие узлы. Перколяции могут наблюдаться в системах, состоящих из большого числа подобных элементов или непрерывных областей, которые работают по принципу триггера [2]. Явление перколяции определяется механизмами протекания: параметрами структуры, через которую протекает поток (узлов и связей в решетке), протекающей подвижной среды и порога перколяции (критической концентрации протекающей среды) [4]. Теория перколяции находит применение в описании разнообразных систем. Различают случайные и скоррелированные перколяции.

В нашем представлении естественный отбор можно сопоставить явлению перколяции [2]. Сеть неустойчивых перколяций стохастична и непрерывно изменяема, а потому не является каналом для передачи информации и основой устойчивого развития системы. Неустойчивые траектории отфильтровываются отбором. Устойчивые (коррелированные) перколяции составляют траекторию эволюции вида или сообщества. Выход популяции или вида на устойчивую траекторию эволюции – пример динамического единства генетического и популяционного уровней, связанных обратными связями в эволюции популяции. В нашем представлении перколяционный фильтр – это физический инструмент, составляющий механизм отбора оптимальных вариантов в потоке мутаций. По сути, естественный отбор не активизирует адаптивную приспособленность популяции, а определяет закономерность прохождения новых мутаций в зависимости от наличия ранее зафиксированных в популяции мутаций (фильтрационные свойства перколяционной решетки).

Самоорганизация поддерживается системой взаимодействий на горизонтальных уровнях – в популяциях. Узлы в перколяционной решетке (особи в популяции – носители и преобразователи мутаций) работают как триггерная вентильная система в потоках мутаций. Триггерные свойства узлов определяют детерминированную составляющую процесса закрепления новых мутаций (пропустить/не пропустить). Взаимодействие мутаций в череде поколений и случайные процессы дрейфа определяют коллективное поведение узлов и связей (мутаций) в пространстве перколяционной решетки. По мере накопления малых флуктуаций (мутаций) и формирования связей между мутациями, малые флуктуации преобразуются в гигантские, и система переходит на новый уровень – обретает новую структуру с новыми функциями – новый вид.

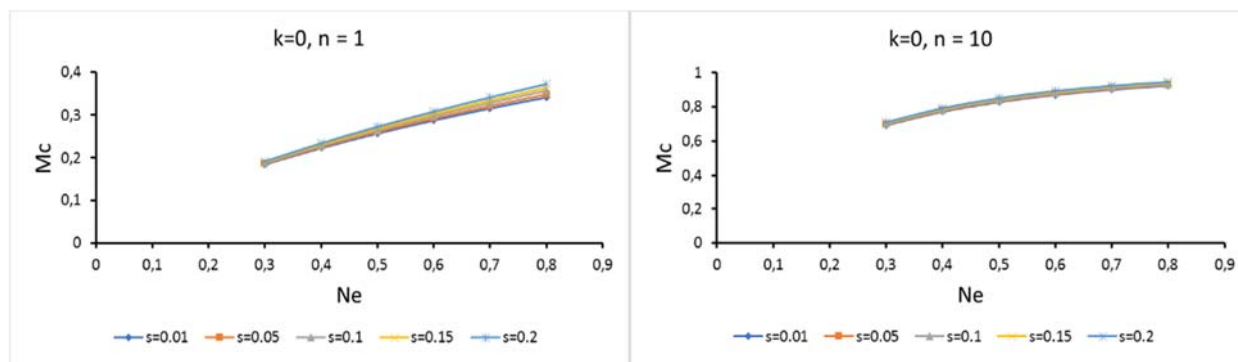


Рисунок 1. Графики зависимости фиксации новых мутаций (в долях от общего количества мутаций) от размера клона носителей мутаций в 1 и 10 поколениях при отсутствии дрейфа ($k = 0$) и различных значениях коэффициента отбора

В данном подходе популяция рассматривается как неоднородная среда, обладающая набором мутаций. В качестве параметров системы отбора рассматриваются:

- доли мутаций от общего количества мутаций в клоне (M_c), а также доли запрещающих (M_R) и разрешающих (M_B) прохождение новых мутаций;
- M_c и M_R рассматриваются вне зависимости от их направленности (положительные, отрицательные и нейтральные мутации в разные временные промежутки могут менять знак в зависимости от параметров среды);
- эффективный размер популяции (N_e) – это размер кластера носителей мутаций (принимает значение в интервале 0,3-0,80 [5-7]),
- минимальное количество поколений, необходимое для закрепления мутации (принимается равным $n = 10$ [8]).
- коэффициент отбора (для природных популяций) принимается равным $0,1 < s < 0,2$ [9]).

При отсутствии дрейфа процесс закрепления мутаций определяется только закономерностями отбора, т.е. наличием в популяции поддерживающих и запрещающих мутаций и их взаимодействием с новыми мутациями.

Состояние перколяционной решетки отбора, при котором формируется минимально достаточное количества носителей новой мутации (минимальный кластер), в нашей модели связано с формированием нижнего порога перколяционной решетки отбора - долей новых мутаций, которые фиксируются в популяции под воздействием детерминированных процессов отбора для минимально воспроизводящей численности клона ($N_e = 0,3$) в 1-ом поколении популяции. В этом случае в 1-ом поколении M_c меняется незначительно в зависимости от значения коэффициента отбора и составляет: 0,188 при $s = 0,05$, 0,189 при $s = 0,1$, 0,191 при $s = 0,15$, 0,193 при $s = 0,2$ (рис. 1).

Среднее число поколений между последовательными фиксациями мутаций только под воздействием детерминированных процессов отбора [10] определяется как

$$T \approx \frac{\exp(2sN_e) - 1}{2\langle M_c \rangle s N_e}, \quad (1)$$

где $\langle M_c \rangle$ – среднее значение доли зафиксированных мутаций (M_c) для заданного N_e , $k = 0$ и s (табл. 1, рис. 2). В таблице представлен расчет для $s = 0,2$. Аналогичные расчеты проведены для всех значений T .

Таблица 1. Данные для расчета среднего числа поколений между последовательными фиксациями мутациями

N_e	$\langle M_c \rangle$	k	s	$2sN_e$	T
0,3	0,5099	0	0,2	0,12	2,089
0,4	0,585	0	0,2	0,16	1,8549
0,5	0,649	0	0,2	0,20	1,8549
0,6	0,694	0	0,2	0,24	1,6281
0,7	0,7346	0	0,2	0,28	1,5710
0,8	0,7682	0	0,2	0,32	1,5340

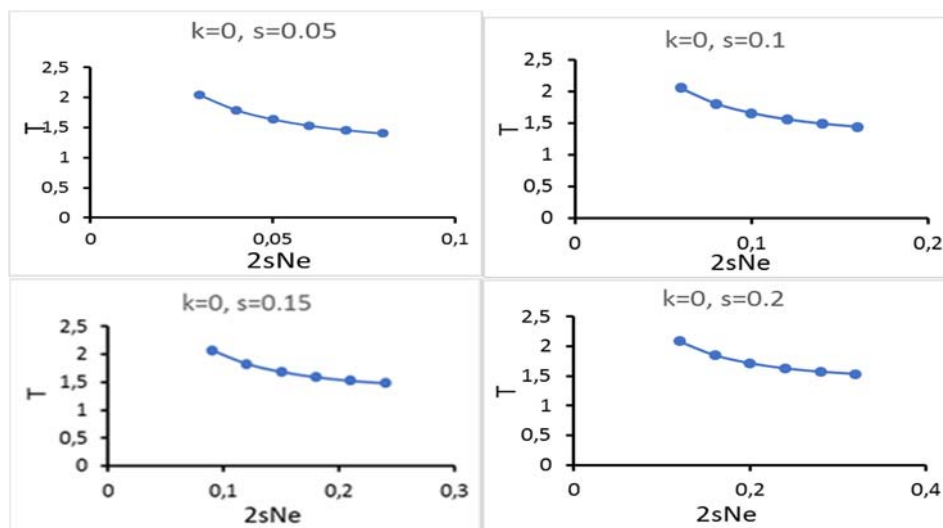


Рисунок 2. Графики зависимости среднего числа поколений между последовательными фиксациями мутаций при отсутствии дрейфа ($k = 0$) от размера клона носителей мутаций и коэффициента отбора

Представленные графики и данные таблицы демонстрируют, что в среднем значение количества поколений, в течение которых способны зафиксироваться мутации под управлением только отбора (при разных значениях s и N_e), составляет 2 поколения. Полученные данные согласуются с необходимым для закрепления мутации количеством поколений ($n = 10$ [8]).

Вероятность фиксации мутаций в общем случае, в соответствии с уравнением $p_C = \frac{N_e s}{\{1 - \exp(-2N_e s)\}}$ [8], возрастает до 0.8, (рис. 3, а). С учетом наличия в популяции ранее закрепившихся поддерживающих и запрещающих мутаций, вероятность фиксации новых мутаций определяется в соответствии с уравнением

$$p_C = \frac{N_e s}{\{1 - \exp(-2N_e s)\}} \cdot \frac{p_R}{p_B}, \quad (2)$$

где вероятность поддерживающих мутаций должна удовлетворять условию $p_R > 0.5$.

В 1-ом поколении при $N_e = 0.3$ значения p_C при $p_R = (0.51 - 0.55)$ и $p_B = 0.5$ для всех исследуемых значений s изменяются линейно (в плоскости прямоугольника) в интервале от 0.52 до 0.57 (в среднем для всех значений s) (рис. 3 б). Это значение p_C соответствует условиям нижнего порога перколяционной решетки, поэтому значение доли новых мутаций (M_C), соответствующее нижнему порогу, тоже растет.

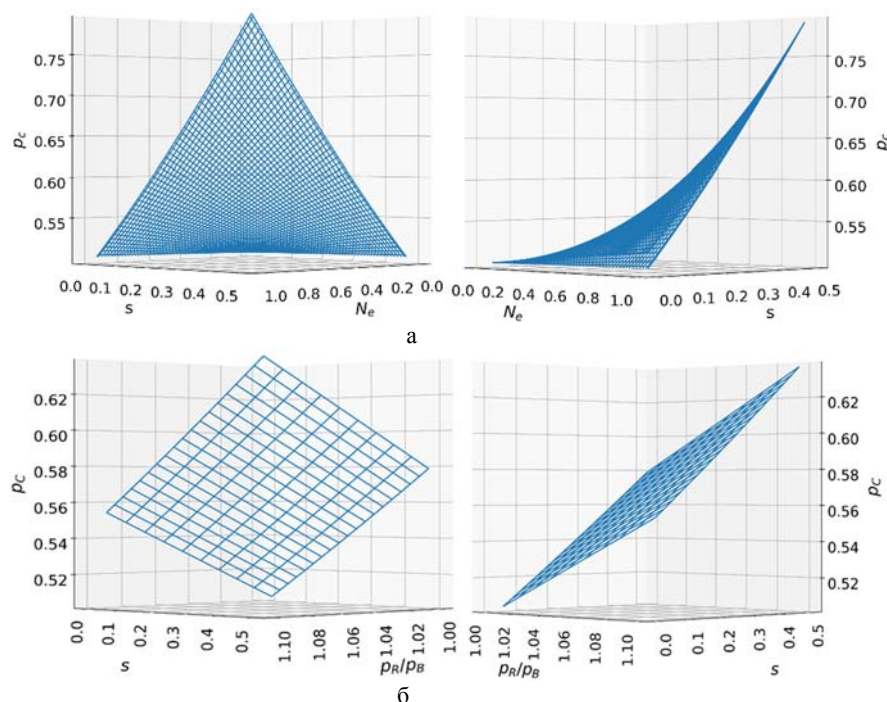


Рисунок 3. Вероятности фиксации мутаций: а) в зависимости от размера клона и коэффициента отбора; б) в зависимости от коэффициента отбора и соотношения $\frac{p_R}{p_B}$ в первом поколении при $p_B = 0.5$ и $N_e = 0.3$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен и разработан новый подход, основанный на представлениях о физическом явлении «протекания» мутаций в ходе естественного отбора как перколяционного фильтра. Показано, что при отсутствии дрейфа процесс закрепления мутаций определяется только детерминированными механизмами отбора, т.е. наличием в популяции поддерживающих и запрещающих мутаций и их взаимодействием с новыми мутациями. Состояние перколяционной решетки отбора, при котором формируется минимально достаточное количества носителей новой мутации (минимальный кластер), в нашей модели связано с формированием нижнего порога перколяционной решетки отбора долей новых мутаций, которые фиксируются в популяции под воздействием только детерминированных процессов отбора ($k = 0$) для минимально воспроизводящей численности популяции ($Ne = 0,3$ от общей численности популяции).

Список литературы / References:

1. Prigogine I., Stengers E. *Order of the chaos. New dialogue between man and nature*. Per., 1986, 432 p.
2. Sidorova A.E., Tverdislov V.A. Self-Organization as the Driving Force for the Evolution of the Biosphere. *MOSCOW UNIVERSITY PHYSICS BULLETIN*, 2012, vol. 68, no. 5, p. 405-410
3. Daniel M. Weinreich, Nigel F. Delaney, Mark A. DePristo, Daniel L. Hartl. Darwinian Evolution Can Follow Only Very Few Mutational Paths to Fitter Proteins. *Science*, 2006, vol. 312, pp. 111-114.
4. Эфрос А.Л. *Физика и геометрия беспорядка*. М.: Наука, 1982, 176 с. [Ephros A.L. *Physics and Geometry of Disorder*. Moscow: Science, 1982. 176 p. (In Russ.)]
5. Nei M., Imaizumi Y. Genetic structure of human populations. II. Differentiation of blood group gene frequencies among isolated populations. *Heredity*, 1966, no. 21, p. 183.
6. Crow J.F., Morton N.E. Measurement of gene frequency drift in small population. *Evolution*, 1955, vol. 9, p. 202.
7. Nunney L.D. Estimating the effective size of conserved populations. *Conservation Biology*, 1994, vol. 8, p. 175.
8. Эбелинг В., Энгель А., Файстель Р. *Физика процессов эволюции*. М.: Эдиториал УРСС, 2001, 211 с. [Ebeling V., Engel A., Feistel P. *Physics of evolutionary processes*. М.: Editorial URSS, 2001, 211 p. (In Russ.)]
9. Grant V. *Organismic evolution*. University of Texas at Austin Foreword by G.G. Simpson, W.H. Freeman [et al.], San Francisco, 1977, 418 p.
10. Santiago E., Caballero A. Joint prediction of the effective population size and the rate of fixation of deleterious mutations. *Genetics*, 2016, vol. 204, no. 3, pp. 1267-1279.

DETERMINED NATURAL SELECTION MECHANISMS
LIKE A PERCOLATION GRID

Garaeva A.Y., Sidorova A.E., Tverdislov V.A.

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics

Leninskie Gory str., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: sky314bone@mail.ru

Abstract. The role of natural selection in biological evolution, reflecting modern biological concepts, is presented systematically. A new approach to the theoretical generalization and mathematical description of this key problem of biology, based on ideas about the physical phenomenon of "flow", has been proposed and developed. The natural selection of optimal variants in the evolutionary mutation flow is considered as a percolation filter - a physical tool that makes up the selection mechanism. It is shown that in the absence of drift, the process of fixing mutations is determined only by determined selection mechanisms, i.e. the presence of supporting and prohibiting mutations in the population and their interaction with new mutations.

Key words: natural selection, self-organization, fluctuation, bifurcation, percolation, mutation.

СООТНОШЕНИЕ САМООРГАНИЗАЦИИ И СЛУЧАЙНЫХ ПРОЦЕССОВ В ПЕРКОЛЯЦИОННОЙ РЕШЕТКЕ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА

Гараева А.Я., Сидорова А.Э., Твердислов В.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: sky314bone@mail.ru
Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. Рассмотрены условия самоорганизации и роль дрейфа в процессе протекания мутаций через перколяционную решетку отбора и их закрепления. С точки зрения флуктуационно-бифуркационного процесса в трехмерной иерархической структуре видообразования определены новые понятия нижнего и верхнего порога мутационного процесса. Рассмотрены верхний и нижний пороги перколяционной решетки отбора как механизмы флуктуационно-бифуркационного развития биологической эволюции на популяционном уровне и видообразования. Показано, что, если нижний порог перколяционной решетки отбора не приводит к качественным изменениям структуры популяции, то верхний порог – это точка бифуркации эволюционного развития популяции, при преодолении которой в популяции возникают необратимые процессы, вызванные накоплением мутаций.

Ключевые слова: естественный отбор, самоорганизация, флуктуации, бифуркации, перколяционные пороги, мутации, дрейф.

Естественный отбор как фильтр – это пассивный элемент, который определяет свойства протекания перколяционной решетки [1]. Новые мутации возникают, как правило, на клональном фоне, а адаптация характеризуется серией отдельных избирательных «зачисток» (так, в популяциях с половым отбором эпистаз может способствовать или не способствовать рекомбинации [2-4]). Клональное доминирование дает мутациям преимущество, особенно, если оно сохраняется в течение длительного времени [5]. В то же время, процесс отбора – проточная открытая система, сквозь которую идет поток мутаций. Давление для протока создает пул мутаций, аналогично давлению газа или жидкости через перколяционный фильтр. Если у физического фильтра есть разность давлений и появляется разность концентраций вещества после протока, в результате отбора-фильтра происходит выборка и фиксация мутаций. Иными словами, при наличии устойчивых (коррелированных) перколяций – мутаций формируется устойчивая траектория эволюции.

В модели мутации (флуктуации) являются источником, обеспечивающим качественный переход популяции на новую ступень иерархической структуры видообразования. Аналогично перколяциям (случайным и скоррелированным [6-7]), процесс переноса мутаций носит как детерминированный (определяется генотипом и фенотипом в ходе отбора), так и случайный характер (генетический дрейф), а выбор траектории развития на популяционном уровне зависит от спектра «разрешающих» и «запрещающих» мутаций [8]. Ограниченность числа допустимых «мутационных траекторий» делает эволюцию в достаточной степени детерминированным процессом, однако непосредственные траектории эволюции в значительной степени определяются случайными процессами.

Фишер предположил, что постоянный приток новых полезных мутаций предопределяет неограниченное повышение пригодности любой популяции (восходящий эффект отбора, который пропорционален генетической дисперсии в приспособленности) [9]. Однако в реальных системах, соотношение вредных мутаций к полезным составляет 1000/1 [10]. В результате, воздействие мутаций, снижающих приспособленность, приспособляемость популяции может снижаться [11]. Поэтому мы рассматриваем мутации (положительные, отрицательные и нейтральные) вне зависимости от их направленности, т.к. вектор их направленности определяется их адаптивной пользой на кратком временном интервале и в дальнейшем, в зависимости от условий среды, может изменить знак. Роль отбора как детерминированной составляющей, в сущности, сводится к работе триггера. Но в целом, взаимодействие мутаций в череде поколений и случайные процессы дрейфа определяют коллективную динамику мутаций в пространстве перколяционной решетки.

Самоорганизация в иерархических структурах поддерживается системой взаимодействий на горизонтальных уровнях, где, по мере накопления малых флуктуаций (мутационного шума) и формирования связей между разноплановыми мутациями, малые флуктуации преобразуются в гигантские, и система переходит на новый уровень – обретает новую структуру с новыми функциями. Поэтому формирование нового вида можно рассматривать как трехуровневый процесс. На первом уровне постоянного белого шума за счет наличия многочисленных случайных процессов процесс определяется точечными взаимодействиями особей – носителей мутаций (рис. 1 а). На этом уровне мутации для единичных особей являются обратимыми (рис. 1 б). В случае достаточного количества носителей новой мутации малые флуктуации перерастают в гигантскую – формирование кластера. На втором уровне происходит локальное взаимодействие кластеров, состоящих из носителей мутаций и начинаются процессы специализации и дифференциации на популяционном уровне. На этом уровне конечный результат в значительной степени определяется детерминированными процессами, что связано с наличием достаточно устойчивых кластеров признаков.

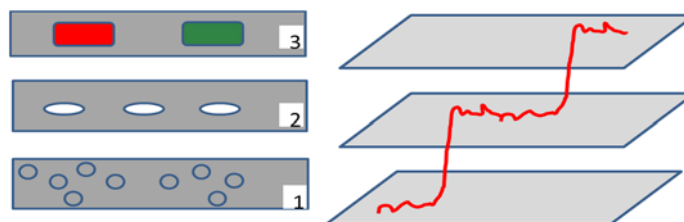


Рисунок 1. Процесс видообразования: а – фазы процесса; б – флуктуационно-бифуркационный механизм видообразования

Согласно [12], вероятность фиксации мутаций в поколениях сначала возрастает к 10-му поколению, а затем мутации (в полосе $\pm 10\%$) ведут себя почти нейтрально, поэтому можно считать, что минимальное количество поколений, необходимое для закрепления мутации равно 10. В случае фиксации мутации в течение 10-ти поколений она считается закрепившейся. Переход со 2 на 3 уровень является точкой бифуркации: возможно формирование нового вида или элиминация носителей мутации. На третьем уровне взаимодействия между популяциями формируется новая гигантская флуктуация, т.е. новая структура – новый вид.

Рассматривается роль дрейфа в процессе закрепления мутаций при следующих параметрах: M_C – доля новых мутаций от общего количества мутаций (нормированных на 1); M_R – доля разрешающих мутаций (нормированных на 1); M_B – доля запрещающих мутаций (нормированных на 1), закрепившихся; N_e – эффективный размер популяции (доля особей от общей численности популяции, способных к размножению и являющихся носителями мутаций - кластер); n – поколения; k – коэффициент дрейфа (согласно расчетам, пороговым значением принимаем величину $k = 0,1$: при $k < 0,1$ в ходе закрепления мутаций доминирует детерминированная составляющая отбора, при $k \geq 0,1$ – дрейф); s – коэффициент отбора. На рисунке 2 представлены графики зависимости фиксации новых мутаций от размера клона носителей мутаций в 1 и 10 поколениях при постоянном значении коэффициента отбора и допороговых значениях коэффициента дрейфа.

Согласно полученным данным, при допороговых значениях коэффициента дрейфа ($k < 0,1$) по мере увеличения коэффициента отбора (s) и размера клона носителей мутаций (N_e) доля новых мутаций (M_C) незначительно возрастает по поколениям. На графике 1 представлена динамика изменения доли новых мутаций в зависимости от размера клона в 1 и 10 поколениях при допороговых значениях коэффициента дрейфа, постоянном значении коэффициента отбора ($s = 0,1$) для трех выборок случайных чисел. При очень малых значениях коэффициента дрейфа $k = 0,001$ (рис. 2 а) доля новых мутаций в 1 и 10 поколениях практически не зависит от дрейфа (линии для всех трех выборок случайных чисел совпадают, а доли мутаций отличаются на десятичные) и при постоянном значении коэффициента отбора (s) определяется только размером клона. Поэтому в 1 поколении графики зависимости фиксации новых мутаций от размера клона носителей мутаций при $k = 0,001$ и $k = 0,01$ носят почти линейный характер.

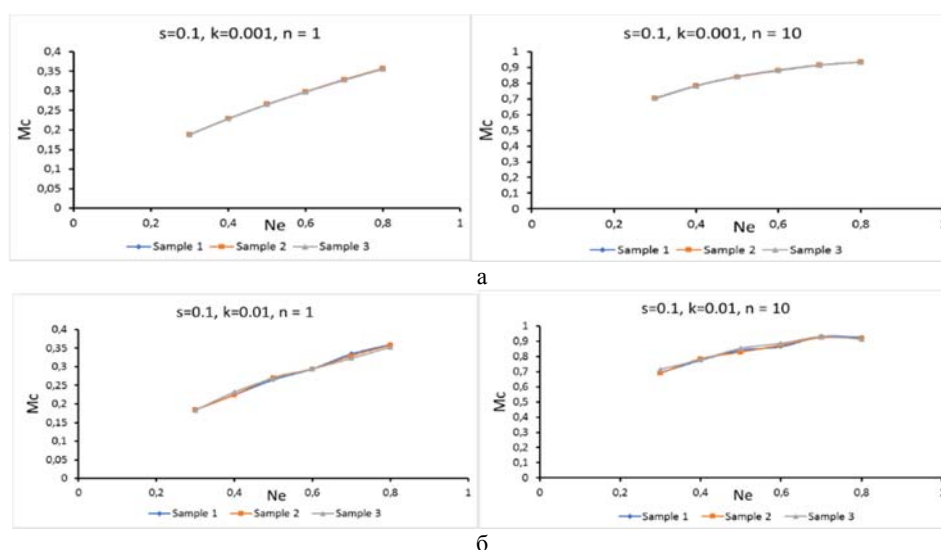


Рисунок 2. Графики зависимости фиксации новых мутаций (в долях от общего количества мутаций) от размера клона носителей мутаций (N_e) в 1 и 10 поколениях при постоянном значении коэффициента отбора $s = 0,1$ и допороговых значениях коэффициента дрейфа ($k < 0,1$): а) $k = 0,001$, б) $k = 0,01$. На графиках представлены значения M_C для трех выборок случайных чисел: выборка №1 – синий цвет, выборка №2 – красный, выборка №3 – серый

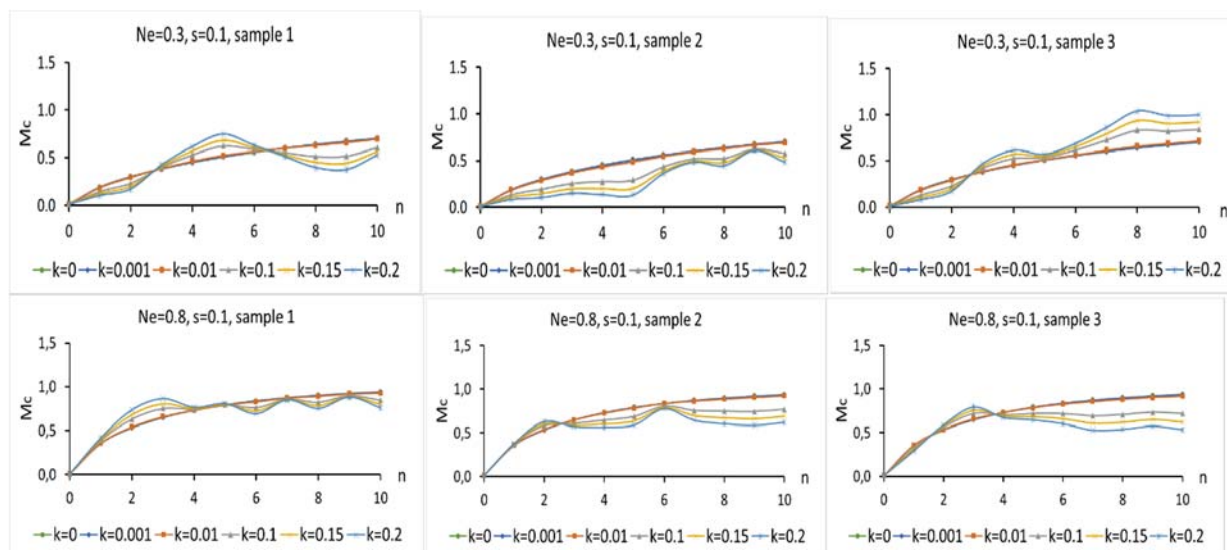


Рисунок 3. Графики изменения доли новых мутаций при разных значениях размера клона (N_e), коэффициента дрейфа (k) и постоянном значении коэффициента отбора ($s = 0,1$)

При увеличении коэффициента дрейфа в 10 раз ($k = 0,01$) (рис. 2 б) отмечено наличие небольших флуктуаций M_c в 1 и 10 поколениях. Полученные данные говорят о том, что при допороговых значениях коэффициента дрейфа ($k < 0,1$) закрепление новых мутаций в основном определяется их взаимодействием с поддерживающими (M_R) и запрещающими (M_B) мутациями, т.е. детерминированными закономерностями отбора. При значениях коэффициента дрейфа больше порогового ($k > 0,1$) для всех исследуемых значений коэффициента отбора для всех значений N_e фиксация мутаций определяется случайными процессами дрейфа. На графике 3 представлена выборка этих значений для $N_e = 0,3$ и $N_e = 0,8$.

Если состояние перколяционной решетки отбора, при котором формируется минимально достаточное количества носителей новой мутации (минимальный кластер), в нашей модели связано с формированием нижнего порога перколяционной решетки отбора (долей новых мутаций, которые фиксируются в популяции под воздействием детерминированных процессов отбора для минимально воспроизводящей численности клона в популяции при $k = 0$), то при преодолении порогового значения коэффициента дрейфа ($k = 0,1$) возможно формирование качественно новой системы. В этом случае возможно формирование как регулярно структурированной системы (нового вида в иерархии видообразования), так и хаотической системы (вымирание популяции под воздействием неблагоприятных мутаций). Поэтому в качестве верхнего порога перколяционной решетки отбора мы определяем такое состояние системы отбора, при котором в популяции возникают необратимые процессы, вызванные накоплением мутаций. Верхний порог перколяций непосредственно определяет состояние самоорганизованной критичности. Это положение подтверждается экспериментальной моделью оценки скорости мутаций двух групп мышей (дикой и мутантной) в течение более 20 поколений [13]. Отсутствие в мутантной группе 3'-5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы δ [14-16] привело к увеличению вероятности возникновения негативных мутаций. Было отмечено увеличение примерно в 17 раз скорости негативных мутаций на нуклеотид за поколение для мутантного типа мышей относительно дикого типа [13]. К 10-15 поколениям сформировались два пути развития – элиминация групп мутантов и формирование новой популяционной структуры из дикого типа (рис. 4).

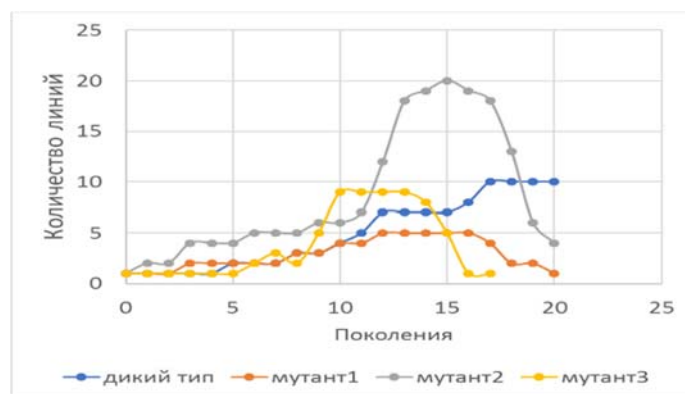


Рисунок 4. График количества линий в родословной дикого мутантного типов (по данным [13])

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Самоорганизация в иерархических структурах поддерживается системой взаимодействий на горизонтальных уровнях. По мере накопления малых флуктуаций (мутаций) и формирования связей между мутациями, малые флуктуации преобразуются в гигантские и обретают новую структуру с новыми функциями. Исходя из этого, формирование нового вида можно рассматривать как трехуровневый процесс. В модели протекания мутаций через перколяционную решетку отбора на популяционном уровне мутации (положительные, отрицательные и нейтральные) рассматриваются вне зависимости от их направленности, т.к. вектор их направленности определяется их адаптивной пользой на кратком временном интервале и в дальнейшем, в зависимости от условий среды, может изменить знак. Состояние перколяционной решетки отбора, при котором формируется минимально достаточное количество носителей новой мутации (минимальный кластер), в нашей модели связано с формированием нижнего порога перколяционной решетки отбора - долей новых мутаций, которые фиксируются в популяции под воздействием только детерминированных процессов отбора ($k = 0$) для минимально воспроизводящей численности популяции ($N_e = 0,3$ от общей численности популяции). При значении коэффициента дрейфа больше порогового $k > 0,1$ процессы фиксации мутаций становятся хаотическими. В этом случае возможно возникновение гигантских флуктуаций и, как следствие, формирование качественно новой системы: регулярно структурированной (формирование нового вида в иерархии видообразования) или хаотической (вымирание популяции под воздействием неблагоприятных мутаций). Верхний порог перколяционной решетки отбора непосредственно определяет состояние самоорганизованной критичности – это точка бифуркации эволюционного развития популяции, при преодолении которой в популяции возникают необратимые процессы, вызванные накоплением мутаций.

Список литературы / References:

1. Sidorova A.E., Tverdislov V.A. Self-Organization as the Driving Force for the Evolution of the Biosphere. *Moscow University physics bulletin*, 2012, vol. 68, no. 5, p. 405.
2. Barton N., Otto S.P. Evolution of recombination due to random drift. *Genetics*, 2005, vol. 169, pp. 2353- 2370.
3. Hill W.G., Robertson A. The effect of linkage on limits to artificial selection. *Genet. Res.*, 1966, vol. 8, p. 269.
4. Otto S.P., Barton N. *Evolution*, 2001, vol. 55, p. 1921.
5. Komarova N.L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111, p. 10789.
6. Frisch, H.L., Hammersley, J.M. Percolation processes and related topics. *J. SIAM*, 1963, no. 11, p. 894-918.
7. Pittel B.G. Bootstrap percolation on the random regular graph. *Random Struct. Alg.*, 2007, no. 1-2, pp. 257-286.
8. Starr T.N., Picton L. K., Thornton J. W. Alternative evolutionary histories in the sequence space of an ancient protein. *Nature*, 2017, vol. 549, no. 7672, pp. 409-413.
9. Fisher R.A. *The Genetical Theory of Natural Selection*. New York: Oxford University Press., 1930, 272 p.
10. Gibson P. [et al.] Can Purifying Natural Selection Preserve Biological Information? *Biological Information – New Perspectives*, 2013, p. 232.
11. Basener W.F., Sanford J.C. The fundamental theorem of natural selection with mutations. *Journal of Mathematical Biology*, 2018, vol. 76, no. 7, p. 1589
12. Эбелинг В., Энгель А., Фейстель Р. *Физика процессов эволюции*. М.: Эдиториал УРСС, 2001, 211 с. [Ebeling V., Engel A., Feistel R. *Physics of evolutionary processes*. М.: Editorial URSS, 2001, 211 p. (In Russ.)]
13. Uchimura A. et al. DNA polymerase δ is required for early mammalian embryogenesis. *PloS one*, 2009, vol. 4, no. 1, p. e4184.
14. Burgers P.M.J. Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no 7, pp. 4041-4045.
15. Prindle M.J., Loeb L.A. DNA polymerase delta in DNA replication and genome maintenance. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2012, vol. 53, no. 9, pp. 666-682.
16. Johnson R.E. et al. A major role of DNA polymerase δ in replication of both the leading and lagging DNA strands. *Molecular cell*, 2015, vol. 59, no. 2, pp. 163-175.

**RATIO OF SELF-ORGANIZATION AND RANDOM PROCESSES
IN THE PERCOLATION GRID OF NATURAL SELECTION**

Garaeva A.Y., Sidorova A.E., Tverdislov V.A.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory str., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: sky314bone@mail.ru

Abstract. The conditions of self-organization and the role of drift in the course of mutations through the percolation selection grid and their fixation are considered. From the point of view of the fluctuation-bifurcation process, new concepts of the lower and upper threshold of the mutation process are defined in the three-dimensional hierarchical structure of speciation. The upper and lower thresholds of the percolation selection grid as mechanisms of the fluctuation-bifurcation development of biological evolution at the population level and species formation are considered. It is shown that if the lower threshold of the percolation selection grid does not lead to qualitative changes in the population structure, the upper threshold is the point of bifurcation of the evolutionary development of the population, which is overcome by irreversible processes in the population caused by the accumulation of mutations.

Key words: *natural selection, self-organization, fluctuations, bifurcations, percolation thresholds, mutations, drift.*

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ХИРАЛЬНОСТИ СПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Луценко А.О., Сидорова А.Э.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234; e-mail: sky314bone@mail.ru
Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. Предложен новый подход к оценке знака хиральности (спиральности и суперспиральности) в структурной иерархии белков. Для определения знака и величины хиральности вторичной структуры белков проведен анализ взаимного расположения α -углеродов. Угол между вектором направления спирали и вектором суммы векторных произведений позволяет однозначно идентифицировать направление вращения спирали в молекуле. Данный метод позволяет построение карт хиральности, где четко обозначены области, соответствующие узкому диапазону возможного угла для двух типов вторичной спиральной структуры.

Ключевые слова: белки, хиральность, энантиомеры, альфа-углерод, правая альфа-спираль, левая полипролиновая спираль, векторное произведение, вектор направления, карта хиральности.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших физических проблем молекулярной биологии является определение механизмов стратификации в иерархиях первичных, вторичных, третичных и четвертичных структур биомакромолекул и их функциональных особенностей. Авторами [1-2]. Выявлена последовательность смены знака хиральности белковых структур (L-D-L-D) и ДНК (D-L-D-L) при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации. Несмотря на убедительность данной теории, принципиально необходимо получить количественные оценки доли и знака хиральности структур разных уровней. На сегодняшний день имеется большое количество работ, где предлагается решение этой проблемы [3-7 и др.]. Развиваемые разными авторами подходы различны, но их объединяет общая цель – получить параметр, который мог бы однозначно охарактеризовать нарушение симметрии и определить знак хиральности. Однако эта проблема на настоящий момент не решена. Поэтому целью данного исследования: дать начало новому подходу оценки хиральности в структурной иерархии белков.

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ХИРАЛЬНОСТИ СПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

В последние годы на кафедре биофизики был разработан принципиально новый метод оценки меры и знака хиральности [8-9]. Для определения знака хиральности вторичной структуры достаточным условием анализа является лишь взаимное расположение α -углеродов C_α . Это позволяет на порядок снизить количество обрабатываемой информации, что является явным преимуществом при обработке больших массивов данных, на что и направлен данный метод. После обработки PDB-файла имеем остов из α -углеродов (рис. 1). Несмотря на то, что в PDB-формате существует классификация из 10 различных спиралей [10], наиболее часто встречающимся типом правой спирали является α -спираль. Левая спираль представлена в виде спирали типа poly(Pro)II (как в коллагене).

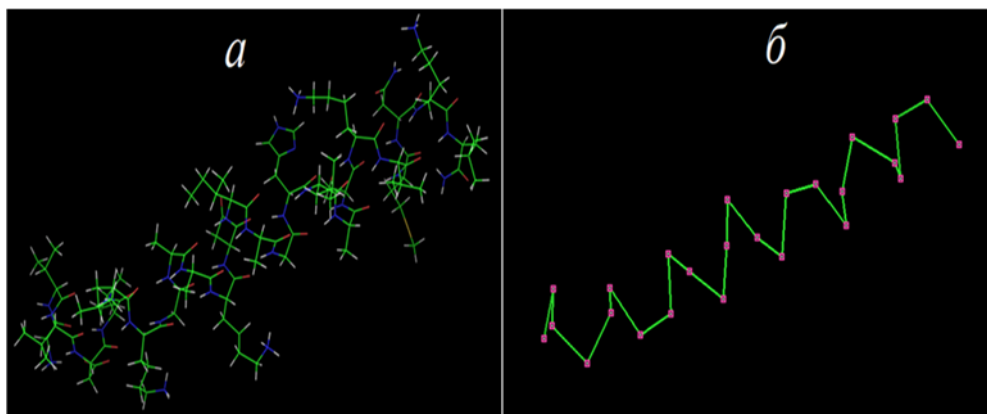


Рисунок 1. Правая α -спираль (PDB: 5UA8 [11]): а – исходное изображение молекулы (380 атомов); б – остов из α -углеродов (25 атомов)

Считаем α -углерод, принадлежащий N-конечной аминокислоте, первым атомом остова – C_1^α , а α -углерод, принадлежащий C-конечной аминокислоте, последним атомом остова – C_n^α . Построив векторы между соседними атомами (от предыдущего к последующему), получаем $(n-1)$ векторов $\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_{n-1}$, сумма которых – вектор направления (рис. 2):

$$\mathbf{v}_1 + \mathbf{v}_2 + \dots + \mathbf{v}_{n-1} = \sum_{i=1}^{n-1} \mathbf{v}_i = \mathbf{d}. \quad (1)$$

Для $(n-1)$ векторов между соседними атомами получаем $(n-2)$ векторных произведений, сумма которых – вектор $\mathbf{s}$:

$$\sum_{i=1}^{n-2} [\mathbf{v}_i \times \mathbf{v}_{i+1}] = \sum_{i=1}^{n-2} \mathbf{v}_i = \mathbf{s}. \quad (2)$$

Скалярное произведение между этими векторами дает косинус угла:

$$\cos \angle(\mathbf{d}; \mathbf{s}) = \frac{\mathbf{d} \cdot \mathbf{s}}{|\mathbf{d}| \cdot |\mathbf{s}|}. \quad (3)$$

Ограничение метода: для определения направления закрутки спирали необходимо минимум 4 опорных точек (атомов), поскольку для построения минимум двух векторных произведений нужно минимум 3 вектора $\mathbf{v}_i$, т.е. минимум 4 точки-атома A_i . Любые 3 точки образуют плоскость, которая в трехмерном пространстве ахиральна.

Угол между вектором направления спирали $\mathbf{d}$ и вектором суммы векторных произведений $\mathbf{s}$ позволяет четко идентифицировать направление закрутки спирали в молекуле: правая или левая. Абсолютная величина суммы векторных произведений $|\mathbf{s}|$ фактически является количественной оценкой закрученности спиральной структуры, своеобразным «запасом хиральности». А знак косинуса угла между векторами $\mathbf{d}$ и $\mathbf{s}$ – $\text{sign}[\cos \angle(\mathbf{d}, \mathbf{s})]$ – позволяет определить направление закрутки: если $\cos \angle(\mathbf{d}; \mathbf{s}) < 0$ – закрутка левая, если $\cos \angle(\mathbf{d}; \mathbf{s}) > 0$ – закрутка правая. Таким образом, величина χ_{total} представляет собой меру хиральности спиральных и суперспиральных структур:

$$\chi_{\text{total}} = \text{sign}[\cos \angle(\mathbf{d}, \mathbf{s})] \cdot |\mathbf{s}|. \quad (4)$$

Увеличение количества правых витков увеличивает χ_{total} , а увеличение количества левых витков уменьшает χ_{total} . Если количество правых и левых витков совпадает, получаем ахиральный объект, где $\chi_{\text{total}} = 0$. Данные по вторичным структурам белков предлагается представлять в виде карт хиральности. По горизонтальной оси на карте хиральности откладывается величина χ_{norm} :

$$\chi_{\text{norm}} = \frac{\chi_{\text{total}}}{(n-2) \cdot |\mathbf{v}|_{\text{mean}}^2} = \frac{\text{sign}[\cos \angle(\mathbf{d}, \mathbf{s})] \cdot |\mathbf{s}|}{(n-2) \cdot |\mathbf{v}|_{\text{mean}}^2}, \quad (5)$$

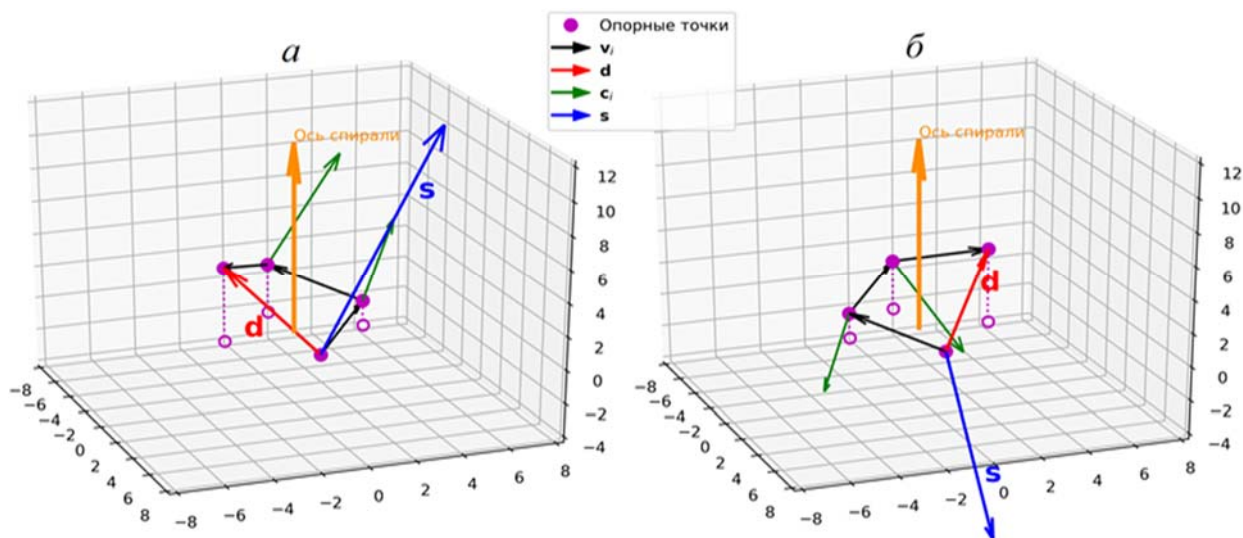


Рисунок 2. Векторы направления и векторных произведений: а – виток правой спирали; б – виток левой спирали

где нормировка представляет собой произведение количества векторных произведений $(n-2)$ на квадрат среднего расстояния между каждыми двумя соседними опорными точками. По вертикальной оси откладывается степень растянутости структуры – отношение $|d|/L$, где L – длина цепочки.

КАРТЫ ХИРАЛЬНОСТИ ВТОРИЧНЫХ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

Рассмотрено 836 белков из 7 классов ферментов по международной классификации: оксидоредуктазы – 152, трансферазы – 86, гидролазы – 145, лиазы – 132, изомеразы – 98, лигазы – 90, транслоказы – 133. Из этого перечня было проанализировано 36,2 тыс. вторичных белковых структур (17,4 тыс. α -спиралей, 15,2 тыс. β -структур, 3,5 тыс. спиралей 310), более 9,0 тыс. осей вторичных структур (8,6 тыс. осей α -спиралей, 388 осей спиралей 310) [10-11]. В белках-ферментах полипролиновые спирали встречаются крайне редко, поэтому они не вошли в выборку. В соответствии с вышеизложенным методом и на основе разработанной на кафедре биофизики компьютерной программы на языке Python 3.7 с использованием библиотеки SciPy построены карты хиральности вторичных структур белков. Данные анализа вторичных белковых структур представлены на (рис.3).

На картах хиральности правые α -спирали и спирали 310 располагаются в области положительных значений $\cos\angle(d, s) > 0$ (т.е. $0^\circ \leq \angle(d, s) < 90^\circ$), а левые полипролиновые – в области $\cos\angle(d, s) < 0$ (т.е. $90^\circ < \angle(d, s) \leq 180^\circ$). На картах хиральности около 90% правых α -спиралей располагается в области $1,1^\circ < \angle(d, s) < 33,9^\circ$, а около 90% правых спиралей 310 – в области $0,7^\circ < \angle(d, s) < 44,1^\circ$; около 90% левых α -спиралей располагается в области $94,4^\circ < \angle(d, s) < 147,0^\circ$, а около 90% левых спиралей 310 – в области $94,9^\circ < \angle(d, s) < 161,0^\circ$. Таким образом, можно утверждать, что данный метод позволяет верно определять направление закрутки спирали.

Некоторое количество спиралей 310 и α -спиралей попало в область левых структур – это левые спирали, зашифрованные в PDB-файле как правые. Визуальный анализ показывает правильность определения направления закрутки представленным методом и демонстрирует наличие ошибок в PDB-файле. Следует отметить, что это существенные ошибки, поскольку левые и правые спирали принципиально различаются по характеристикам.

На карте хиральности правые α -спирали, в целом, располагаются ниже спиралей 310, что объясняется плотной упаковкой витков. Почти все α -спирали имеют $\chi_{\text{norm}} > 0$, что подтверждает адекватность метода. Можно также отметить соответствие с картами Рамачандрана: правые α -спирали располагаются рядом с правыми спиральями 310.

β -цепочки располагаются выше, т.к. это растянутые и плоские структуры. Пространственную структуру β -структур можно определить как «почти плоские зигзаги». Здесь проявляется общее свойство двоякоизогнутой поверхности. Отдельный β -тяж имеет левое скручивание, и в этом случае скрученность β -листа считается левой, и, если смотреть на поворот линии водородных связей вдоль β -тяжей, считается правой.

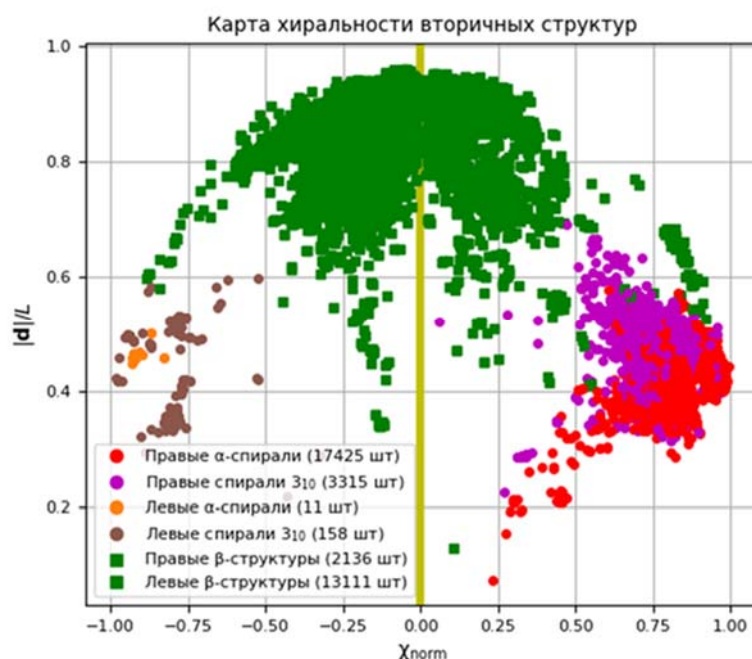


Рисунок 3. Обобщающая карта хиральности вторичных структур белков для 7 классов ферментов: по вертикальной оси отложена степень растянутости структуры (отношение $|d|/L$, где L – длина цепочки)



Рисунок 4. Обобщающая карта хиральности осей вторичных структур белков для 7 классов ферментов: по вертикальной оси отложена степень растянутости структуры (отношение $|d|/L$, где L – длина цепочки)

Данные для определения знака хиральности использовались из базы данных PDB [10-11], где представлены оба метода определения характеристик этих структур. Поэтому на карте хиральности большая часть β -структур расположена в области $72,2^\circ < \angle(d; s) < 141,6^\circ$ (в среднем). Это обстоятельство требует разработки метода определения хиральности именно данных структур.

Расчет хиральности осей вторичных структур белков проводился в соответствии вышеизложенным методом и данными PDB [10-11] (рис. 4). На картах хиральности осей вторичных структур (рис. 4) отмечается более слабая степень закрутки осей по сравнению с закруткой спиралей (рис. 3). Для правых α -спиралей и спиралей 310 этот угол составляет, в среднем, 70° – 90° , а для левых структур (α -спиралей и спиралей 310) – 90° – 110° . Эти данные подтверждают общую тенденцию знака хиральности правых и левых вторичных структур белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принципиально новый метод количественной оценки хиральных структур носит общий характер и позволяет достаточно полно характеризовать вторичную структуру белков: тип и знак хиральности, а также получить информацию о пространственной структуре. Результаты обработанных данных подтвердили, что достаточным условием для определения знака хиральности белковых структур является взаимное расположение α -углеродов аминокислот, а знак косинуса угла между векторами позволяет определить направление закрутки вторичных структур. Метод посвящен поиску возможности описать единым физическим параметром иерархию структур белковых молекул в представлениях «нарушений симметрии», связанных с энтропией системы. Принципиально важно, что все эти структурные уровни, независимо от типа симметрии, обладают общим симметричным свойством – хиральностью. Метод расчета и оценки хиральности вторичных структур белков реализован посредством компьютерной программы на языке Python 3.7 с использованием библиотеки данных PDB. В отличие от широко известных карт Рамачандрана [6], определяющих только преобладающую конформацию аминокислот в белке [12], не позволяющих определять знак хиральности и не применимых к нуклеиновым кислотам, наш метод позволяет определять хиральность сурспиралей, -структур и нуклеиновых кислот.

Список литературы / References:

1. Tverdislov V.A., Malysheko E.V. On regularities in the spontaneous formation of structural hierarchies in chiral systems of nonliving and living matter. *Physics Uspekhi*, 2019, vol. 62, no. 4, pp. 354-363.
2. Твердислов В.А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 1, с. 159-164. [Tverdislov V.A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular-biological systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 159-164. (In Russ.)]
3. Petitjean M. On the root mean square quantitative chirality and quantitative symmetry measures. *Journal of Mathematical Physics*, 1999, vol. 40, no. 9, pp. 4587-4595.
4. Avnir D., Hel-Or H., Mezey P. Symmetry and chirality: Continuous measures. *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, 1998, vol. 4, pp. 2890-2901.
3. Luzanov A.V., Nerukh D. Simple one-electron invariants of molecular chirality. *Journal of mathematical chemistry*, 2007, vol. 41, no. 4. P. 417-435.

4. Pinsky M. [et al.] Analytical methods for calculating continuous symmetry measures and the chirality measure. *Journal of computational chemistry*, 2008, vol. 29, no. 16, pp. 2712-2721.
6. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol. Biol.*, 1963, vol. 7, no. 1, pp. 95.
7. Randic M. Graph theoretical descriptors of two-dimensional chirality with possible extension to three-dimensional chirality. *Journal of chemical information and computer sciences*, 2001, vol. 41, no. 3, pp. 639-649.
7. Raos G. Degrees of chirality in helical structures. *Macromolecular theory and simulations*, 2002, vol. 11, no. 7, pp. 739-750.
8. Sidorova A.E., Malyshko E.V., Kotov A.R., Tverdislov V.A., Ustinin M.N. Quantitative Criteria of Chirality in Hierarchical Protein Structures. *Biophysics*, vol. 64, no. 2, pp. 155-166.
9. Sidorova A.E., Malyshko E.V., Kotov A.R., Levashova N.T., Ustinin M.N., Tverdislov V.A. Protein Folding as an Autowave Process of Self-Organization in Active Media. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2019, vol. 83, no. 1, pp. 85-90.
10. The Protein Data Bank. URL: <http://www.rcsb.org/>
11. PDB File Format Documentation. URL: <http://www.wwpdb.org/documentation/file-format> (accessed: 04.05.2019)
12. Овчинников Ю.А. *Биоорганическая химия*. Просвещение. М., 1987, 815 с. [Ovchinnikov Y.A. *Bioorganic chemistry*. Enlightenment. M., 1987, 815 p. (In Russ.)]

QUANTIFICATION OF CHIRALITY SPIRAL PROTEIN STRUCTURES

Lutsenko A.O., Sidorova A.E.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory str., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: sky314bone@mail.ru

Abstract. A new approach to evaluating the sign of chirality (helicity and superhelicity) in the structural hierarchy of proteins is proposed. To determine the sign and magnitude of the chirality of the secondary structure of proteins, an analysis of the relative location of α -carbons was carried out. The angle between the vector of the helix direction and the vector of the sum of vector products allows to unambiguously identify the direction of rotation of the helix in the molecule. This method allows the construction of chiral maps, where the areas corresponding to the narrow range of possible angles for the two types of secondary helix structure are clearly marked.

Key words: proteins, chirality, enantiomers, alpha-carbon, right alpha-helix, left polypyrroline helix, vector product, direction vector, chirality map.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОБРАЗОВАНИЯ КЛАСТЕРОВ РЕЦЕПТОРОВ ПРОИЗВОЛЬНОГО РАЗМЕРА

Гарсон Дасгупта А.К., Свешникова А.Н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: andreigarzondk@gmail.com

Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. Процесс кластеризации рецепторов при связывании с лигандом играет важную роль в процессе ответа клетки на сигнал и может быть связан как с активацией внутриклеточных процессов, так и с конформационными перестройками в молекуле рецептора, что приводит к изменению аффинности молекул рецепторов друг к другу. Повышение локальной концентрации рецепторов влияет на связывание лиганда и, как следствие, на весь дальнейший сигнальный путь. Так как кинетика кластеризации рецепторов управляет скоростью ответа клетки на активатор, необходимо провести теоретическое исследование возможных механизмов этого процесса. В работе исследуется процесс кластеризации рецепторов в наиболее общем случае. Были построены компьютерные модели разной сложности, отражающие гипотезу о изменении аффинности рецепторов друг к другу при связывании с лигандом. Валидация компьютерной модели проводилась по опубликованным данным о кластеризации рецепторов GPVI на поверхности тромбоцита [1]. В работе показано, что кластеризация приводит к такому стационарному распределению кластеров, которое обеспечивает их максимальную локальную концентрацию. Так же было показано, что упрощенная модель позволяет описать процесс без потери точности, что дает возможность использования её в более сложных моделях.

Ключевые слова: кластеризация, рецепторы, математическое моделирование.

Формирование кластера рецепторов происходит из-за присоединения или отсоединения отдельных рецепторов или кластеров с кластерами меньшего размера. Похожий механизм обнаружен в ряде других процессов, таких как агрегация и полимеризация.

Различия между кластеризацией, агрегацией и полимеризацией вытекают из размерности этих процессов. Агрегация считается наиболее общим случаем. Существует много подходов для описания процессов агрегации и кластеризации. Основным и наиболее широко используемым является решение уравнения Смолуховского [2]. Чтобы получить теоретическое предсказание о распределении агрегатов по размерам, нужно решить уравнение с использованием соответствующих методов, требующих достаточно вычислительной мощности.

Другой часто используемый подход - это модели клеточных автоматов. Клеточные автоматы – это дискретные модели с определенным набором правил для временной эволюции. Этот подход может быть одним из наиболее точных, но из-за продолжительности и масштаба реакций для его решения требуется неоправданно большое вычислительное время, как и в случае подхода Смолуховского.

Одним из самых простых подходов, наиболее часто используемых для полимеризации, являются модели, основанные на законе действующих масс [3]. Этот подход основан на том, что скорость взаимодействия двух химических реагентов прямо пропорциональна их концентрации в реакционной системе, а достижимое состояние химического равновесия зависит от скоростей прямой и обратной реакций. Для описания процесса достаточно решить систему дифференциальных уравнений, используя известные методы.

МОДЕЛИРОВАНИЕ

Так как механизмы кластеризации до конца не изучены, то были построены различные математические модели для описания данного процесса.

Для простоты предположим, что взаимодействие частиц друг с другом является простой обратимой реакцией. Поэтому построенные модели были основаны на законе действующих масс и состоят из набора дифференциальных уравнений. Все системы являются системами конечного числа частиц. В начальный момент времени все системы состоят только из свободных одиночных частиц.

Модели были построены в среде Python 2.7 и COPASI. Валидация и подбор параметров осуществлялся с помощью методов, включенных в данные программы, а именно с помощью алгоритма Левенберга — Марквардта и с помощью метода роя частиц.

Модель I. Экспериментальные и теоретические результаты, приведенные в [4], показывают, что кластеризация рецепторов на поверхности клетки происходит в основном из-за прикрепления и открепления отдельных рецепторов или димеров. Следовательно, мы предполагаем, что это единственно возможные процессы в нашей системе.

Кластер рецепторов не может расти до бесконечно больших размеров, что связано с силами взаимодействия рецепторов друг с другом и ограниченностью мембраны. Учитывая все вышеперечисленные условия, составим систему уравнений, описывающую рассматриваемый процесс:

$$\begin{aligned}\frac{dp}{dt} &= -k_1 p \sum_{i=1}^{N-1} [i] + k_{-1} \left(\sum_{i=2}^N [i] + [2] \right) \\ \frac{d[2]}{dt} &= -k_2 [2] \sum_{i=1}^{N-2} [i] + k_{-2} \left(\sum_{i=3}^N [i] + [4] \right) \\ &\dots \\ \frac{d[j]}{dt} &= k_1 ([j-1][p] - [j][p]) + k_{-1} ([j+1] - [j]) + k_2 ([j-2][2] - [j][2]) + k_{-2} ([j+2] - [j])\end{aligned}$$

где p описывает концентрацию одиночных рецепторов; $[i]$ – концентрацию кластеров размера i ; k_1 – вероятность присоединения одиночного рецептора к кластеру; k_{-1} – отсоединение одиночного рецептора от кластера; k_2 – вероятность присоединения димера к кластеру; k_{-2} – отсоединение димера от кластера; N – максимально возможный размер кластера. Данная система состоит из N дифференциальных уравнений, каждое из которых описывает динамику изменения концентрации кластеров соответствующего размера.

Модель II. Оказывается, что модель кластеризации в первом приближении может быть упрощена и сведена к системе, которая состоит только из двух дифференциальных уравнений. Пренебрегая различиями в кластерах и, следовательно, их распределением по размерам, мы можем обозначить концентрацию кластеров только через одну переменную, не учитывающую количество рецепторов в кластере. Следующие уравнения описывают получившуюся систему:

$$\begin{aligned}\frac{dp}{dt} &= -k_1 np - 2k_2 p^2 + k_{-1} n, \\ \frac{dn}{dt} &= k_2 p^2 - k_{-2} n^2 + k_3 n,\end{aligned}$$

где p описывает концентрацию одиночных рецепторов, n – концентрацию агрегатов, k_2 вероятность образования кластера из двух одиночных, k_{-1} – вероятность присоединения рецептора к кластеру, k_{-2} – вероятность отсоединения одиночного рецептора от кластера, k_3 – вероятность распада кластера на два других.

В результате работы была произведена валидации обеих модели по данным о кластеризации рецептора GPVI на поверхности тромбоцита. Обе модели в точности описали экспериментальные данные (рис. 1).

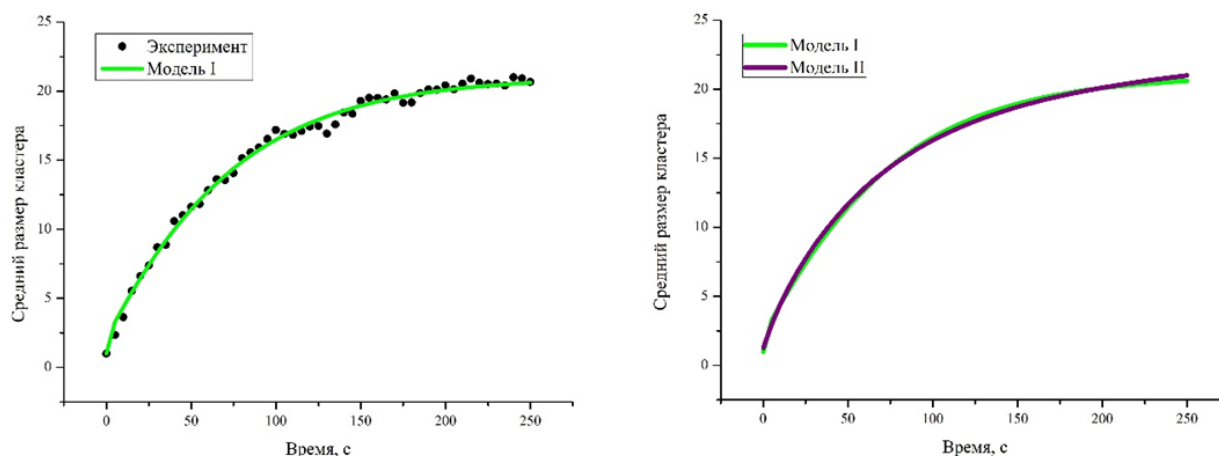


Рисунок 1. Простая модель соответствует экспериментальной кривой среднего размера кластеров для кластеризации GPVI на поверхности мембраны тромбоцитов. Упрощение общей модели не влияет на точность аппроксимации

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Анализ модели кластеризации показал, что процесс имеет следующие характерные особенности:

- 1) Кластеризация рецепторов является необратимым процессом.
- 2) Стационарное состояние определяется не параметрами, а их соотношениями k_2/k_{-2} , k_1/k_{-1} , которые представляют собой коэффициент ассоциации соответствующих реакций. Параметры сами по себе характеризуют время, необходимое для достижения этого стационарного состояния.
- 3) Есть только 3 типичных стационарных состояния: некластеризованное, в основном димерное и состояние полной кластеризации (рис. 2).

Таким образом, в предположении изменения аффинности кластеризация приводит к такому стационарному распределению кластеров, которое обеспечивает их максимальную локальную концентрацию. Использование упрощенной модели II дает возможность быстрой оценки параметров кластеризации и возможность использования в качестве составной части более сложных моделей, благодаря её простоте.

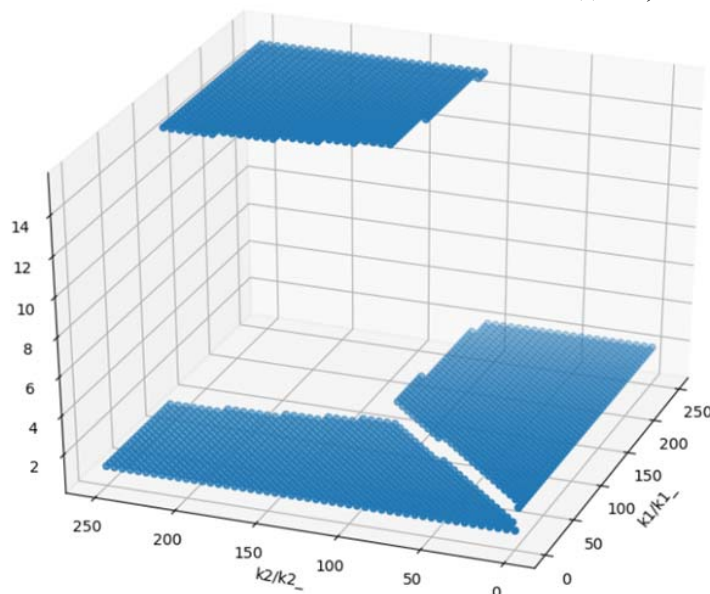


Рисунок 2. Размер преобладающих кластеров в стационарном состоянии. Показано, что существует только 3 типичных стационарных состояния, которые зависят от k_2/k_{-2} , k_1/k_{-1} . Данные получены для модели кластеризации с ограничением максимального размера $N = 15$

Список литературы / References:

1. Poulter N.S., Pollitt A.Y., Owen D.M., Gardiner E.E., Andrews R.K., Shimizu H., Jung S.M. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2017, vol. 15, no. 3, pp. 549-564. DOI: 10.1111/jth.13613.
2. Odriozola G., Schmitt A., Callejas-Fernández J., Martínez-García R., Leone R., Hidalgo-Álvarez R. Simulated reversible aggregation processes for different interparticle potentials: The cluster aging phenomenon. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, vol. 107, no. 10, pp. 2180-2188. DOI: 10.1021/jp0262160.
3. Lahiri S., Wang Y., Esposito M., Lacoste D. Kinetics and thermodynamics of reversible polymerization in closed systems. *New Journal of Physics*, 2015, vol. 17, no. 8. DOI: 10.1088/1367-2630/17/8/085008.
4. Choquet D., Triller A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Reviews Neuroscience*, 2003, vol. 4, no. 4, pp. 251-265. DOI: 10.1038/nrn1077.

**MATHEMATICAL MODEL OF THE FORMATION OF CLUSTERS OF RECEPTORS
OF ARBITRARY SIZE****Garzon Dasgupta A.K., Sveshnikova A.N.**

Moscow State University

Leninskie gory str., 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: andreigarzondk@gmail.com

Abstract. The process of receptor clustering upon binding to the ligand plays an important role in the process of cell response to the signal, which can be associated with the activation of intracellular processes, as well as with conformational rearrangements in the receptor, which lead to a change in the affinity of the receptor molecules to each other. Increasing the level of local reception affects ligand binding. The process of receptor clustering controls the rate of cell response to the activator. The aim of this work is to study the clustering of receptors in the most general case. Computer models of varying complexity were constructed, reflecting the hypothesis of a change in receptor affinity for each other when linked to a ligand. Validation of computer models was carried out according to published data on the clustering of GPVI receptors on the platelet surface. As a result of the work, it was shown that the stationary state in the system can be either trivial or the state of maximum clustering, when most of the receptors are in clusters of the largest size. The simplified model describes the process without loss of accuracy, that allows to use it in more complex models.

Key words: *clustering, receptor, mathematical modelling.*

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА: ОПЫТ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДИНАМИКИ ТРАНСГЕННЫХ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Брильков А.В., Брилькова Е.В.², Ганусов В.В.², Жабрун И.В.², Логинов Ю.Ю.³

¹ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

² Институт биофизики ФИЦ СО РАН

Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: evmorbril@mail.ru

³ Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф. Решетнева

пр. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660037, РФ; e-mail: loginov@sibsau.ru

Поступила в редакцию: 28.07.2019

Аннотация. Настоящая статья посвящена математическому моделированию динамики популяций трансгенных микроорганизмов (ГМО) при культивировании в хемостате. Причины нестабильности трансгенных микроорганизмов при длительном периодическом или непрерывном культивировании в хемостате не совсем понятны до сих пор. Почему клетки, содержащие плазмиды с клонированными генами, растут медленнее бесплазмидных также неясно: или это прямое влияние экспрессии плазмидных генов на жизнеспособность плазмидсодержащих клеток, ингибирование клеточного роста или же расходование клеточных ресурсов на поддержание плазмид. Оценка параметров нестабильности плазмид с помощью методов, предложенных в настоящей работе, является первым шагом к пониманию главной причины: почему трансгенные микроорганизмы теряют плазмиды при культивировании и не теряют их в природе (плазмидный парадокс).

Ключевые слова: трансгенные микроорганизмы, нестабильность плазмид, математическое моделирование, стоимость плазмид, непрерывное культивирование микроорганизмов, хемостат.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых технологий с использованием генетически модифицированных организмов (ГМО) обещает немалые перспективы в производстве, медицине, сельском хозяйстве, биоремедиации [1]. Однако существует и значительный риск негативных последствий, связанный с неконтролируемым распространением ГМО в окружающей среде [2]. Сама проблема оценки выживания и распространения ГМО даже в простых модельных экосистемах (хемостат и микроэкосистемы как модели природных экосистем) является многоуровневой и достаточно сложной [3].

Для оценки «стоимости» поддержания клонированных в/на плаزمидных генов трансгенных микроорганизмов при периодическом и хемостатном культивировании проанализирована математическая модель динамики популяций трансгенных микроорганизмов, основанная на известной модели Левина-Стьюарта [4]. В этой модели выживание трансгенных микроорганизмов в хемостате с ограничением роста недостатком ресурса (субстрата) определяется селективным преимуществом бесплазмидных клеток и вероятностью потери или передачи плазмид. В настоящей работе показано, что нестабильность трансгенных микроорганизмов возрастает при эффективной экспрессии клонированных генов, что в модели Левина-Стьюарта не учитывается.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПОПУЛЯЦИЙ ТРАНСГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Математическая модель Левина-Стьюарта, описывающая популяционную динамику плазмиднесущих микроорганизмов в хемостате, основывается на описании динамики популяций плазмидсодержащих (X^+) и бесплазмидных (X^-) клеток с учетом вероятности потери плазмиды (τ) при делении и вероятности передачи плазмиды в процессе конъюгации (γ) [4]:

$$\begin{cases} \frac{dX^+}{dt} = \mu^+ X^+ - DX^+ - \tau\mu^+ X^+ + \gamma X^+ X^-, \\ \frac{dX^-}{dt} = \mu^- X^- - DX^- + \tau\mu^+ X^+ - \gamma X^+ X^-, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu^+ X^+}{Y^+} - \frac{\mu^- X^-}{Y^-}, \end{cases} \quad (1)$$

где X^+ , X^- – концентрации плазмиднесущих и бесплазмидных клеток, τ – вероятность потери клеткой плазмиды; γ – параметр скорости конъюгационного переноса, D – удельная скорость разбавления среды в хемостате; S , S_0 – концентрации субстрата в ферментере и на входе; μ^+ , μ^- – удельные скорости роста популяций плазмидного и бесплазмидного штаммов: $\mu^+ = \mu_{\max}^+ S / (K_s^+ + S)$, $\mu^- = \mu_{\max}^- S / (K_s^- + S)$; $\mu_{\max}^+$, $\mu_{\max}^-$, K_s^+ , K_s^- , Y^+ , Y^- – максимальные скорости роста, константы Моно и коэффициенты экономичности потребления субстрата для плазмидсодержащего и бесплазмидного вариантов.

Модель Левина-Стюарта (1) является вариантом известных в экологии и биофизике микробных популяций моделей Лотки-Вольтерра и хемостата Моно-Герберта [5, 6]. С помощью модели (1) и её обобщений удалось объяснить целый ряд экспериментальных данных, в том числе, длительное поддержание популяции неконкурентоспособных трансгенных бактерий в хемостате и водных экосистемах [7].

Влияние эффективности экспрессии клонированных генов на параметры неустойчивости трансгенных бактерий. Математическая модель Левина-Стюарта (1) описывает динамику популяций трансгенных бактерий. Большинство рекомбинантных плазмид, содержащих клонированные гетерологичные гены, являются неконъюгативными (гены, обеспечивающие конъюгативный перенос плазмид, занимают достаточно большой объем на плазмиде и обычно не включаются в состав векторов для клонирования, как, например, в популярных векторах pBR322, pUC18 и др.). Учитывая этот факт, можно упростить модель (1), найти ее аналитическое решение и оценить параметры неустойчивости трансгенных микроорганизмов α и τ .

Предлагаемый ниже метод оценки параметров α и τ основан на использовании приближения квазистационарного роста, наблюдаемого в начале и в конце культивирования в хемостате. Параметр α характеризует «селективное преимущество бесплазмидных клеток» [4] $\alpha = 1 - \mu^+(S) / \mu^-(S)$ или «давление отбора» [8]. Отметим, что часто используемый близкий по смыслу параметр «стоимость приспособленности» (fitness cost) отличается от α и определяется «fitness cost» не по разнице скоростей размножения трансгенной и бесплазмидной популяций как α , а по динамике численностей этих популяций в конкурентных экспериментах [7]. Параметр τ характеризует вероятность потери плазмиды при делении клеток.

Перейдем к новой переменной z , выражающей отношение числа бесплазмидных клеток в популяции к числу плазмидсодержащих:

$$z = \frac{X^-}{X^+}. \quad (3)$$

Тогда

$$\dot{z} = \frac{\dot{X}^-}{X^+} - z \frac{\dot{X}^+}{X^+}, \quad (4)$$

или подставляя из (2) выражение для $\dot{X}^+$ и $\dot{X}^-$, получаем:

$$\dot{z} = \mu^-(S)[\alpha + \tau(1 - \alpha)]z + \mu^-(S)\tau(1 - \alpha), \quad (5)$$

где $\alpha = 1 - \mu^+(S) / \mu^-(S)$ – относительное селективное преимущество популяции бесплазмидных клеток.

Рассмотрим динамику популяций в состоянии, близкому к стационарному, когда доля клеток, содержащих плазмиды, мала, т.е. $z \gg 1$.

В этом случае можно положить:

$$\mu^-(S) \approx D. \quad (6)$$

С учетом допущений (6, 7) уравнение (5) переписывается следующим образом:

$$\dot{z} - Dbz - aD = 0, \quad (7)$$

где $a = \tau(1 - \alpha)$, $b = \alpha + a$.

Решение уравнения (7) имеет вид:

$$z = -\frac{a}{b} + \left(z_0 + \frac{a}{b}\right) \cdot \exp(bDt), \quad (8)$$

где z_0 – начальное значение z .

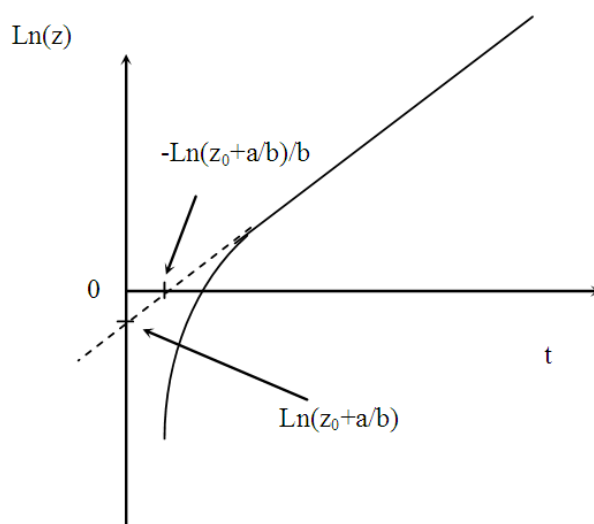


Рисунок 1. Определение параметров нестабильности трансгенных бактерий α и τ графическим способом. Сплошная линия описывается уравнением (9), штриховая – уравнением линейной регрессии. По оси абсцисс – время в безразмерных единицах Dt

Таким образом, динамика замещения плазмидного штамма бесплазмидным в хемостате в состоянии, близкому к стационарному, описывается следующим выражением:

$$\frac{X^-}{X^+} = -\frac{\tau(1-\alpha)}{\alpha + \tau(1-\alpha)} + \left[\frac{X_0^-}{X_0^+} + \frac{\tau(1-\alpha)}{\alpha + \tau(1-\alpha)} \right] \cdot \exp([\alpha + \tau(1-\alpha)] \cdot D \cdot t). \quad (9)$$

Используя выражение (9), можно определить значения α и τ по экспериментальным данным. Они находятся с помощью аппроксимации зависимости $\ln(z) = f(t)$ прямой линией при $z \gg a/b$ (рис. 1).

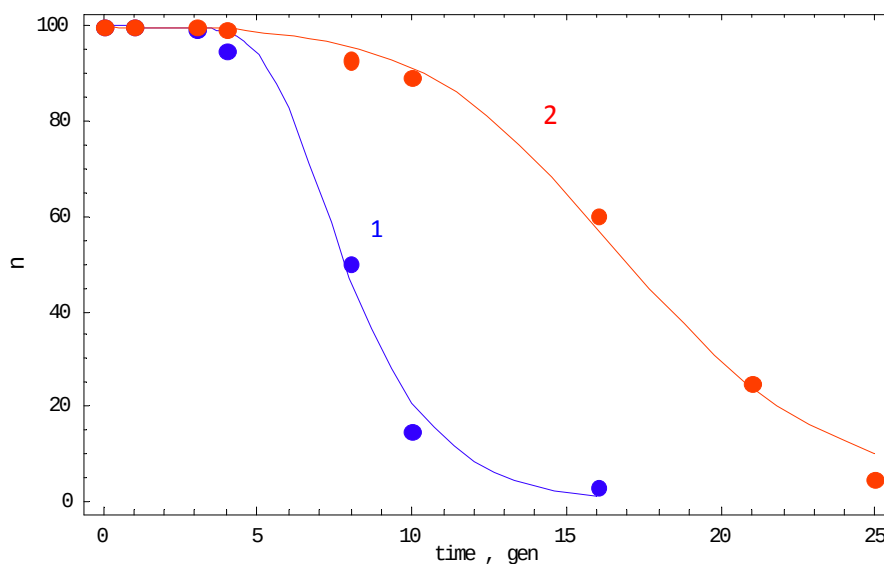


Рисунок 2. Влияние экспрессии клонированных в *E. coli* Z905 (pPHL-7) генов биолуминесценции морских светящихся бактерий на нестабильность трансгенной популяции при культивировании в хемостате на различных субстратах-источниках углерода и энергии: 1 – на глицерине, 2 – то же на глюкозе. По оси ординат – доля плазмидосодержащих клеток в популяции; по оси абсцисс – время в генерациях бесплазмидной популяции. Точки – экспериментальные данные, непрерывные линии – расчеты по модели (1) с параметрами $D = 0,1 \text{ час}^{-1}$, $S_0 = 100$, $K_s = 0,01$, $\alpha_1 \approx 0,80$ (на глицерине), $\alpha_2 \approx 0,36$ (на глюкозе), $\tau_2 \approx 0,80$ (на глюкозе), $\tau_1 \approx 0,55 \cdot 10^{-4}$ (на глицерине)

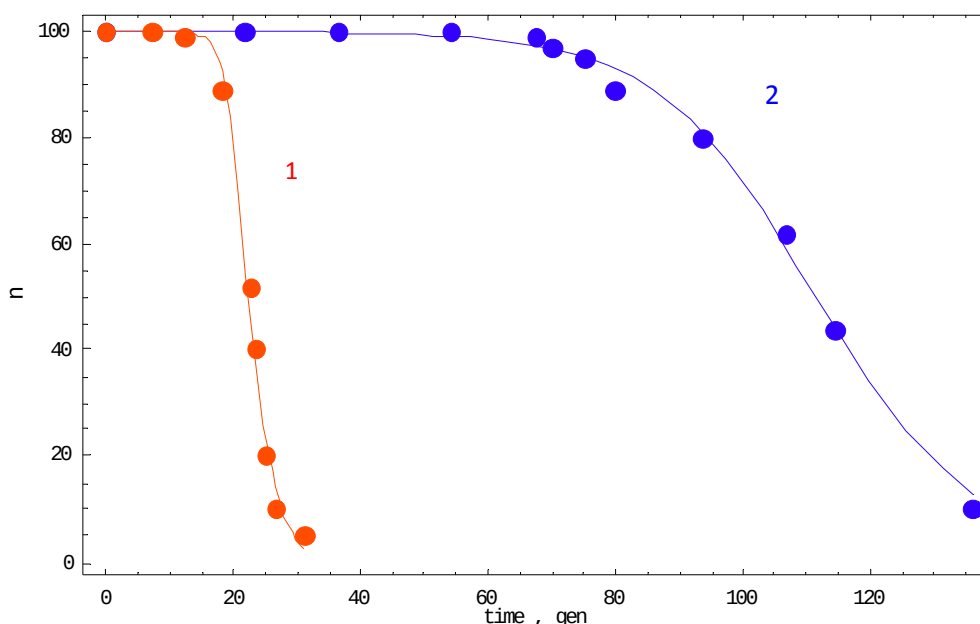


Рисунок 3. Влияние удельной скорости размножения в хемостате на параметры нестабильности плазмидсодержащих бактерий *E. coli* K-12, (pBR322). Точки на графиках – экспериментальные данные [10], непрерывные линии – расчеты по формуле (9). 1 – $D = 0,1 \text{ час}^{-1}$, 2 – $D = 0,3 \text{ час}^{-1}$. Параметры нестабильности: $\alpha_1 \approx 0,52$, $\alpha_2 \approx 0,11$, $\tau_2 \approx 9,8 \cdot 10^{-8}$, $\tau_2 \approx 1,0 \cdot 10^{-5}$

Проведем оценку параметров нестабильности трансгенных плазмидсодержащих бактерий *Escherichia coli* Z905 (pPHL-7) при ограничении роста недостатком источника углерода и энергии (глицерин или глюкоза) в хемостате (рис. 2).

Нестабильный рекомбинантный штамм *E. coli* Z905 (изогенный бесплазмидный штамм *E. coli* K-12), содержит плазмиду pPHL-7, в составе которой находятся клонированные под контролем *lac*-промотора в векторе pUC18 гены люминесцентной системы морских светящихся бактерий *P. leiognathi* [9]. Так как лактозный промотор является катаболитчувствительным, от типа лимитирующего рост субстрата – глицерин или глюкоза – зависит эффективность экспрессии клонированных *lux*-генов, что должно приводить к разной скорости элиминации плазмидсодержащих клеток. Действительно, как видно из экспериментальных данных, приведенных на рис. 2, длительность поддержания плазмидных клеток на среде с глюкозой значительно выше, чем на среде с глицерином. Таким образом, экспрессия клонированных *lux*-генов, является важным (если не основным) фактором, определяющим стоимость плазмид для клеток трансгенных бактерий в хемостате.

Нестабильность трансгенных бактерий при различных скоростях размножения в хемостате. Рассмотрим эксперименты Wouters с соавт. [10], в которых авторы исследовали длительность поддержания рекомбинантного штамма *E. coli* PC 221 (вариант штамма *E. coli* K-12), содержащего плазмиду pBR322, при разных удельных скоростях разбавления среды в хемостате при лимитировании по фосфору (источнику энергии). Оценка параметров нестабильности плазмидсодержащих бактерий приведена на рисунке 3.

Расчеты показывают, что стоимость плазмид резко возрастает при низких скоростях размножения плазмидсодержащих бактерий в хемостате (рис. 3). что может быть связано:

- 1) со снятием репрессии с энергозависимых промоторов, приводящему к повышению эффективности экспрессии плазмидных генов, при этом полное число копий плазмиды на хромосому не меняется;
- 2) с увеличением средней копийности плазмид на хромосому, что приводит к повышению метаболической нагрузки на плазмидсодержащие клетки бактерий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Модели Левина-Стюарта принадлежит особое место в описании динамики популяций трансгенных микроорганизмов. По познавательной ценности ее можно сравнить с моделью Ходжкина-Хаксли в биофизике возбудимых мембран [5]. Однако существует ряд экспериментальных данных, которые не учитываются в математической модели (1). Например, влияние экспрессии клонированных на плаزمиде генов (рис. 2), изменение параметров нестабильности при низких скоростях размножения бактерий (рис 3), снижение числа копий плазмид у многокопийных штаммов микроорганизмов с течением времени [11], длительное сохранение плазмидсодержащих клеток бактерий в природных экосистемах несмотря на высокую стоимость поддержания плазмид (плазмидный парадокс) [12]. Эти экспериментальные факты не описывается моделью Левина-Стюарта, так как она относится к случаю однокопийного плазмидсодержащего штамма, а большинство трансгенных микроорганизмов являются многокопийными. Анализ математической модели (1) позволяет оценить «стоимость» поддержания плазмид трансгенных микроорганизмов (fitness cost) при периодическом (многократные пересевы, «transfer») и хемостатном культивировании (continuous culture), вероятность

выживания генетически модифицированных организмов (ГМО) в природных экосистемах и, таким образом, является первым шагом к прогнозированию экологических последствий интродукции.

Список литературы / Reference:

1. Kumar N.M., Muthukumaran C., Sharmila G., Gurunathan B. Genetically Modified Organisms and Its Impact on the Enhancement of Bioremediation. *Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management. Energy, Environment, and Sustainability*, 2018, pp. 53-76.
2. de Santisa B., Stockhofe N., Walc J.-M. [et al.] Case studies on genetically modified organisms (GMOs): Potential risk scenarios and associated health indicators. *Food and Chem. Toxicology*, 2018, vol. 117, pp. 36-65.
3. Bril'kov A.V., Ganusov V.V., Morozova E.V. and Pechurkin N.S. Computer modeling of the biotic cycle formation in a closed ecological system. *Adv. Space Res.*, 2001, vol. 27, no. 9, pp. 1587-1592.
4. Levin B.R., Stewart F.M. The population biology of bacterial plasmids: A priori conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics*, 1977, vol. 87, no. 10, pp. 209-228.
5. Ризниченко Г.Ю. *Лекции по математическим моделям в биологии*. М.: Ижевск: Изд-во НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2011, 560 с. [Riznichenko G.Yu. *Lectures on mathematical models in biology*. M.: Izhevsk: RCD Publishing, 2011, 560 p. (In Russ.)]
6. Gitelzon I.I., Pechurkin N.S., Bril'kov A.V. *Population Problems in the Biology of Unicellular Organisms*. London: Harwood Academic Publ. GmbH, United Kingdom, 1989, 77 p.
7. San Millan A., Peña-Miller R., Toll-Riera M., Halbert Z.V., McLean A.R., Cooper B.S., MacLean R.C. Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nature Communications*, 2014, vol. 5, article number: 5208.
8. Moser H. *The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat*. Carnegie Institution of Washington, 1958.
9. Ganusov V.V., Bril'kov A.V. Estimating the instability parameters of plasmid-bearing cells. I. Chemostat culture. *J. of Theor. Biol.*, 2002, vol. 219, no. 2, pp. 193-205.
10. Wouters J.T.M., Driehuis F.L., Polaczek P.J. [et al.] Persistence of the pBR322 plasmid in *Escherichia coli* K12 grown in chemostat cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1980, vol. 46, no. 4, pp. 353-362.
11. Fedorec A.J.H., Ozdemir T., Doshi A. [et al.] Two New Plasmid Post-segregational Killing Mechanisms for the Implementation of Synthetic Gene Networks in *Escherichia coli*. *Science*, 2019, vol. 14, pp. 323-324.
12. MacLean R.C., Alvaro S.M. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current Biology*, 2015, vol. 25, no. 17, pp. R753-R773.

ECOLOGICAL BIOPHYSICS: MATHEMATICAL MODELLING EXPERIENCE OF TRANSGENIC MICROBIAL POPULATIONS DYNAMICS

Bril'kov A.V.¹, Bril'kova E.V.², Ganusov V.V.², Jabrun I.V.², Loginov Yu.Yu.³

¹ Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

² Institute of biophysics FRC SB RAS

Akademgorodok, 50 building 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: evmorbril@mail.ru

³ Reshetnev Siberian State University of Science and Technology

Krasnoyarskii rabochii pr., 31, Krasnoyarsk, 660037, Russia; e-mail: loginov@sibsau.ru

Abstract. The paper is devoted to mathematical modeling of transgenic microbial populations (GMO) dynamics during cultivation in the chemostat. Even at present time we do not completely understand why and how transgenic microorganisms are unstable during prolonged butch or chemostat cultivation. The exact mechanisms by which containing cloned genes plasmid-bearing cells grow at a slower rate than their plasmid-free counterparts are also unclear whether it is a direct effect of plasmid gene expression on the viability of plasmid-bearing cells, inhibition of the cell growth, or the use of cell resources on plasmid maintenance. Estimation of the plasmid instability parameters according to the methods developed in this paper is the first step in understanding the major causes of why transgenic microorganisms plasmids are lost in culture or not lost in nature (plasmids paradox).

Key words: transgenic microorganisms, plasmids instability, mathematical modeling, cost of plasmids, continuous cultures of microorganisms, chemostat.

ВЛИЯНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ ИЗ ЛИЗОЦИМА НА МОДИФИКАЦИЮ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Венская Е.И., Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: e.i.rusina@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. Изучено влияние амилоидных фибрилл на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов человека *in vitro*. Контроль за процессом образования амилоидных фибрилл из лизоцима куриного яйца осуществляли флуоресцентным методом с использованием тиофлавина Т. Эксперименты проведены на эритроцитах крови практически здоровых доноров. Клетки инкубировали в растворе, содержащем амилоидные фибриллы, затем из них выделяли изолированные эритроцитарные мембраны. О структурном состоянии мембран эритроцитов человека судили по степени везикуляции клеток при их метаболическом истощении, модификацию белков эритроцитарных мембран оценивали по параметрам флуоресценции зондов N-(1-пирен) малеимида (ПМ), отражающего уровень сульфгидрильных групп, и 4-4'-диацетамидо-2,2'-стильбендисульфоната (ДИДС), специфически связывающегося с белком полосы 3. В качестве контролей использовали эритроциты, проинкубированные при таких же условиях в среде, содержащей нативный лизоцим, а также в среде, не содержащей белковых компонентов. Обнаружено, что трехчасовая инкубация клеток в растворе, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима, приводит к ускорению процесса везикуляции эритроцитов при их метаболическом истощении, снижению интенсивности флуоресценции специфического к SH-группам белков N-(1-пирен) малеимида и связанного с белком полосы 3 4-4'-диацетамидо-2,2'-стильбендисульфоната, по сравнению с контрольными клетками. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, воздействуя на эритроциты человека *in vitro*, вызывают модификацию структурного состояния их мембран, проявляющуюся в повышении отделения от эритроцитов части мембранного материала – везикул, снижении уровня белковых SH-групп и модификации структурного состояния белка полосы 3 в мембранах эритроцитов человека.

Ключевые слова: эритроциты, амилоидные фибриллы, лизоцим, мембранные белки.

Известно, что белковые молекулы способны образовывать нерастворимые β -складчатые структуры – амилоидные фибриллы, которые накапливаются в организме, образуя бляшки в головном мозге, сердце, печени, почках, поджелудочной железе, кровеносных сосудах и других органах. С накоплением амилоидов связывают такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, сахарный диабет 2 типа, боковой амиотрофический склероз и другие системные и локальные амилоидозы [1]. При этом в развитии данных патологий принимают участие конкретные специфические предшественники амилоидных белков. Например, β -амилоидный белок связан с развитием болезни Альцгеймера; амилин – с сахарным диабетом 2 типа; β 2-микроглобулин – с гемодиализным амилоидозом [1].

Считается, что все белки способны образовывать амилоидные фибриллы *in vitro*, при этом, несмотря на различия белков-предшественников, амилоидные фибриллы из них обладают общими свойствами, характерными всем амилоидам: имеют β -складчатую структуру и связываются со специфическими красителями – тиофлавином Т и конго красным, а также обладают двойным лучепреломлением в поляризованном свете [2]. В данной работе мы использовали амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима куриного яйца, как модельный объект для изучения влияния амилоидов на клетки крови человека. Лизоцим активно используется в качестве модельного объекта для изучения структуры и свойств белков [3], в молекуле лизоцима обнаружены участки, способные взаимодействовать друг с другом, а также амилоидогенные свойства данного белка [4]. Описаны амилоидозы, вызванные отложением амилоидных фибрилл из лизоцима, образованных *in vivo*, преимущественно в печени, селезенке и почках [5]. Однако, представленные в литературе данные не отражают полностью процессы, происходящие с мембранами клеток при действии на них амилоидов, до сих пор не ясны механизмы клеточной токсичности амилоидных фибрилл.

Целью данной работы явилось изучение влияния амилоидных фибрилл на процессы везикуляции эритроцитов человека при их метаболическом истощении и выявление степени модификации мембранных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение амилоидных фибрилл. Для получения и исследования амилоидов в данной работе был использован лизоцим куриного яйца [4]. Амилоидные фибриллы были получены кислотным методом, при котором лизоцим куриного яйца (Fluka) растворяли в 10 мМ растворе соляной кислоты (рН 2,0) и инкубировали в термостате при 65°C в течение 5-7 суток, постоянно перемешивая. Исходная концентрация лизоцима в

растворе составляла 20 мг/мл. Для предотвращения бактериального загрязнения в раствор добавляли 200 ppm азид натрия. В качестве контроля использовали раствор лизоцима куриного яйца (20мк/мл) в 10мМ соляной кислоте, который инкубировали в течение того же времени при комнатной температуре, не перемешивая.

Выделение клеток крови. В работе были использованы образцы крови практически здоровых доноров, полученные в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. В качестве консерванта для крови использовали гепарин (РУП «Белмедпрепараты»). Эритроциты выделяли путем центрифугирования при 3000 g, 5 мин., затем трижды отмывали в физиологическом растворе NaCl.

Выделение эритроцитарных мембран. Эритроцитарные мембраны (тени эритроцитов) выделяли по методу Доджа [6]. Гемолиз эритроцитов проводили при разведении 1 объема клеток в 10 объемах 5 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,4) при 4°C в течение 12 ч. Мембраны эритроцитов многократно отмывали от гемоглобина в 5 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) при 18000 g (центрифуга K-24, Германия). Выделение теней эритроцитов проводили при температуре 2-4°C. Концентрацию белка в тенях эритроцитов определяли по модифицированному методу Лоури [7]. В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (Merck, Германия).

Оценка процесса везикуляции эритроцитов при метаболическом истощении. Эксперименты проведены на 10%-ной суспензии эритроцитов в забуференном растворе NaCl, pH 7,4. Данную суспензию обрабатывали амилоидными фибриллами и инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. В процессе инкубации отдельные образцы центрифугировали (3000 g, 5 мин) и в супернатантах определяли активность ацетилхолин эстеразы (АХЭ), по величине которой судили о степени микровезикуляции эритроцитов, как в работе [8].

Спектрально – люминесцентные измерения. Измерение параметров зондовой флуоресценции проводили на люминесцентном спектрофотометре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь). Уровень SH-групп в мембранах эритроцитов определяли с помощью N-(1-пирен) малеимида (ПМ) – зонда, флуоресцирующего при связывании с SH-группами белков. Для проведения флуоресцентных измерений связывания ПМ с тенями эритроцитов, предварительно обработанных амилоидными структурами (концентрация белка 0,1 мг/мл) в суспензию мембран добавляли ПМ в конечной концентрации зонда 5 мкМ. Измерение параметров флуоресценции зонда проводили после 15-минутной инкубации образцов при 25 °С. Для обработки эритроцитарных мембран 4-4'-диацетамидо-2,2'-стильбендисульфатом (DIDS) к 5 объемам суспензии мембран (концентрация белка 0,2 мг/ мл) добавляли 1 объем 10^{-5} М DIDS. Образцы хорошо перемешивали и выдерживали 30 мин при 37°C. Затем мембраны отмывали в забуференном NaCl, содержащем 0,5% сывороточного альбумина быка и 2 раза – без альбумина. К полученным осадкам добавляли по 2 мл забуференного NaCl. Спектры люминесценции DIDS регистрировали в области 390-600 нм при $\lambda_{возб} = 365$ нм.

Контроль за образованием фибрилл осуществляли спектрофлуориметрическим методом с использованием зонда тиюфлавина Т (Sigma). Для этого готовили стоковый раствор тиюфлавина Т (1 мг/мл). Далее 1,6 мкл стокового раствора растворяли в 1 мл PBS-буфера и добавляли 5 мкл раствора амилоидных фибрилл. Конечная концентрация тиюфлавина Т составляла 10 мкМ. Измерения проводили при длине волны возбуждения 435 нм, регистрации – 482 нм.

Лизоцим куриного яйца – это белок, состоящий из 129 аминокислотных остатков, обладающий амилоидогенными свойствами. Причем лизоцим относится к группе белков, амилоидные формы которых образуются *in vivo* и обнаруживаются в организме при патологиях. В процессе образования амилоидных фибрилл происходит структурная перестройка белковых молекул, они принимают типичный для всех амилоидных белков вид – фибриллы содержат большое количество упорядоченных β -слоев, которые могут чередоваться с α -спиралями. Все фибриллы вне зависимости от их происхождения стабилизируются сетью внешних и внутримолекулярных водородных связей между основными амидными группами цепи и карбонильными группами. С помощью электронной микроскопии было установлено, что амилоидные фибриллы представляют собой нити, диаметр которых составляет 7,5-10 нм [3]. Для изучения структурной организации амилоидных фибрилл применяют специальный краситель - бензотиазолиновый зонд тиюфлавин Т, который специфически связывается с фибриллами, широко используется в гистологическом анализе амилоидов *ex vivo* и *in vitro*. Известно, что этот зонд используется для определения поперечных сшивок β -слоя во время агрегации амилоидных фибрилл [9]. Мы использовали данный зонд для контроля образования амилоидных фибрилл из лизоцима куриного яйца. Параметры флуоресценции зонда определяли ежедневно в контрольном и опытном растворах. Обнаружено увеличение интенсивности флуоресценции зонда в течение первых 5-6 суток инкубации с выходом на плато к седьмым суткам, что позволяет сделать вывод об образовании зрелых амилоидных фибрилл. Интенсивность флуоресценции зонда в контрольном образце не изменялась (рис. 1). Полученные в течение 6-7 суток инкубации зрелые амилоидные структуры из лизоцима были использованы для проведения экспериментов.

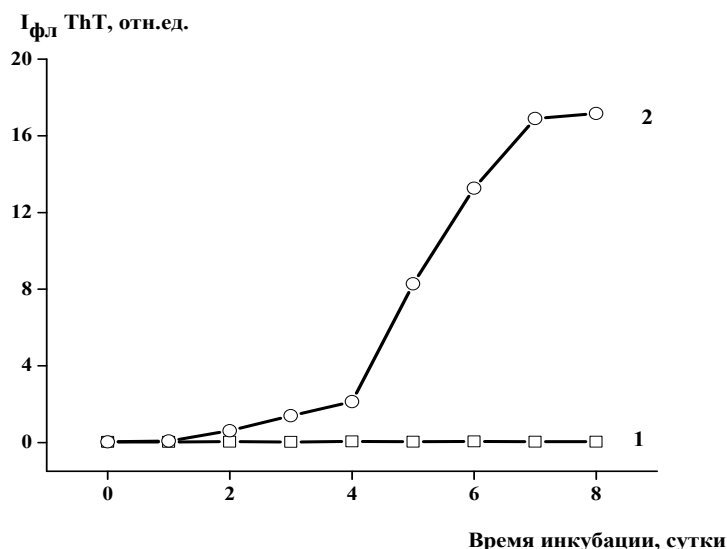


Рисунок 1. Изменение интенсивности флуоресценции теофлавина Т ($\lambda_{\text{возб.}} = 435$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 482$ нм), в зависимости от времени инкубации лизоцима в различных инкубационных средах: 1 – лизоцим, инкубируемый в 10 мМ растворе соляной кислоты (рН 2,0) при 65 °C и непрерывном перемешивании; 2 – лизоцим, инкубируемый в 10 мМ растворе соляной кислоты при комнатной температуре

С целью выяснения механизмов токсического действия амилоидов на эритроциты было изучено влияние амилоидных фибрилл на процессы везикуляции эритроцитов человека при их метаболическом истощении и выявление степени модификации мембранных белков, оцениваемой по параметрам флуоресценции ПМ, отражающего уровень сульфгидрильных групп, и ДИДС, специфически связывающегося с белком полосы 3.

Известно, что одним из параметров, характеризующих жизнеспособность эритроцитов, является их везикуляция при метаболическом истощении клеток. В результате от АТФ-истощенных эритроцитов происходит отделение микровезикул, не содержащих спектрина. Отделение части мембранного материала от эритроцитов человека может рассматриваться как окончательный этап изменения формы клеток от дискоцитов к эхиноцитам. Воздействие на организм неблагоприятных факторов окружающей среды, применение ряда лекарственных препаратов могут вызывать в эритроцитах процесс отделения с поверхности плазматической мембраны части мембранного материала (микровезикуляция клеток), что ведет к изменению функциональных свойств эритроцитов и сокращению продолжительности их жизни [8]. Отделение мембранного материала от клетки происходит и при физиологических условиях – например, при старении эритроцитов *in vivo*. Нами изучено влияние амилоидных структур, полученных из лизоцима, на степень везикуляции эритроцитов человека при метаболическом истощении клеток *in vitro*. Серия экспериментов по изучению влияния белковых олигомеров, полученных из лизоцима, на степень везикуляции эритроцитов человека показала, что предварительная инкубация эритроцитов человека с амилоидными структурами в течение 3-х часов вызывает ускорение степени везикуляции эритроцитов в безглюкозной среде. После 40-часового выдерживания клеток в безглюкозной среде уровень везикуляции эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур, был значительно выше по сравнению с эритроцитами, предварительно проинкубированными такое же время с раствором лизоцима (рис. 2).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, воздействуя на эритроциты человека *in vitro*, вызывают модификацию структурного состояния их мембран, проявляющуюся в повышении отделения от эритроцитов части мембранного материала – микровезикул.

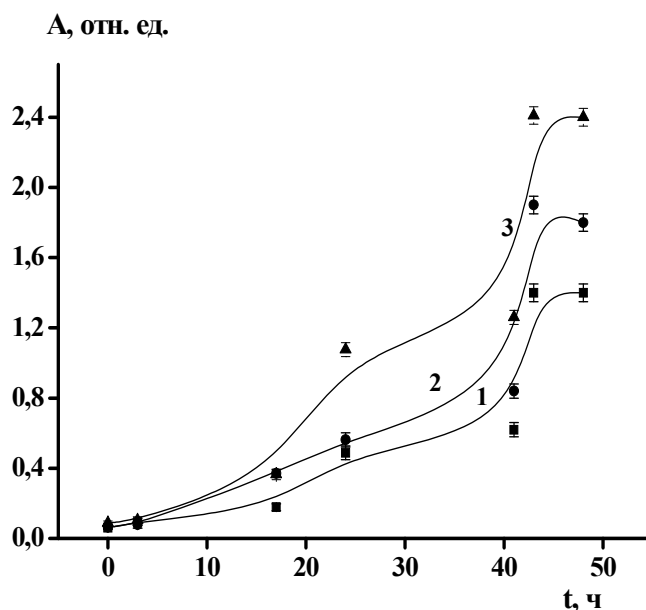


Рисунок 2. Влияние амилоидных структур на активность ацетилхолинэстеразы (А, отн. ед.) в супернатантах, полученных после осаждения эритроцитов, после инкубации их суспензии в забуференном NaCl при 37 °С: 1 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4 (контроль); 2 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем 10 мг/мл лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере. За 100% принято значение активности ацетилхолинэстеразы в супернатантах, полученных после осаждения контрольных эритроцитов

Для выяснения механизмов действия амилоидов на белки мембран эритроцитов человека в данной работе исследовали влияние амилоидных фибрилл на уровень белковых SH-групп и структурное состояние интегрального белка полосы 3, ответственного за транспорт анионов в эритроцитарных мембранах.

Сульфгидрильные группы, находящиеся на мембранах эритроцитов, способны взаимодействовать с различными ксенобиотиками, что приводит к изменению физико-химического состояния липидного бислоя мембран посредством нарушения белок-липидных взаимодействий, которые могут происходить при окислении SH-групп и сшивании мембранных белков. Уровень SH-групп в мембранах эритроцитов определяли с помощью N-(1-пирен) малеимида (ПМ) – зонда, флуоресцирующего при связывании с SH-группами белков. Для проведения измерений эритроциты предварительно инкубировали в буферном растворе, содержащем либо лизоцим, либо амилоидные фибриллы из лизоцима. Затем выделяли эритроцитарные мембраны (концентрация белка в мембранах составляла 0,1 мг/мл) и в суспензию теней эритроцитов добавляли ПМ в конечной концентрации зонда 5 мкМ. После 15-минутной инкубации образцов при 25 °С проводили измерение спектров флуоресценции ПМ (рис. 3).

Установлено, что интенсивность флуоресценции ПМ снижается в мембранах, выделенных из эритроцитов, предварительно обработанных амилоидными структурами в течение 3 ч, по сравнению с мембранами, полученными из эритроцитов, предварительно проинкубированных то же время с раствором лизоцима (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что в мембранах эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл из лизоцима, происходит снижение уровня белковых SH-групп.

Одним из структурных компонентов цитоскелета мембраны эритроцитов является белок полосы 3, отвечающий за транспорт хлорид-, бикарбонат-, неорганических фосфат-анионов, а также играющий важную роль в стабилизации структуры цитоскелета, что обеспечивается связями между цитоплазматическими фрагментами белка полосы 3, анкирином и спектрином.

Для того чтобы оценить, влияют ли амилоидные фибриллы на структурное состояние интегрального белка полосы 3 в эритроцитарных мембранах, мы использовали специфический флуоресцирующий ингибитор анионного транспорта – 4-4'-диацетамидо-2,2'-стильбендисульфат (ДИДС), который связывается с белком полосы 3. Показано, что в выделенных из предварительно проинкубированных с амилоидами эритроцитов мембранах наблюдается значительное снижение интенсивности флуоресценции ДИДС по сравнению с мембранами, полученными из эритроцитов, предварительно проинкубированными в тех же условиях с раствором лизоцима (рис. 4).

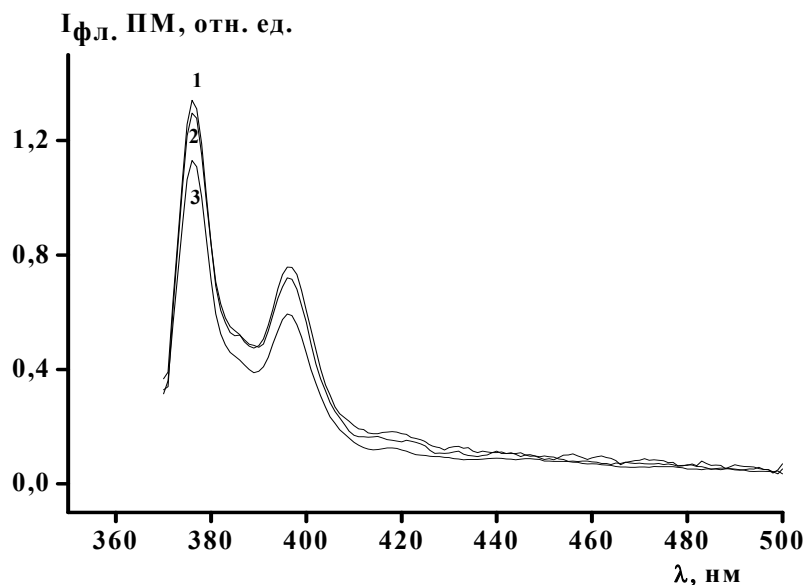


Рисунок 3. Спектры флуоресценции ПМ, встроенного в мембраны, изолированные из эритроцитов до и после воздействия амилоидных фибрилл. Условия инкубации суспензии эритроцитов: 1 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4 (контроль); 2 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем 10 мг/мл лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере

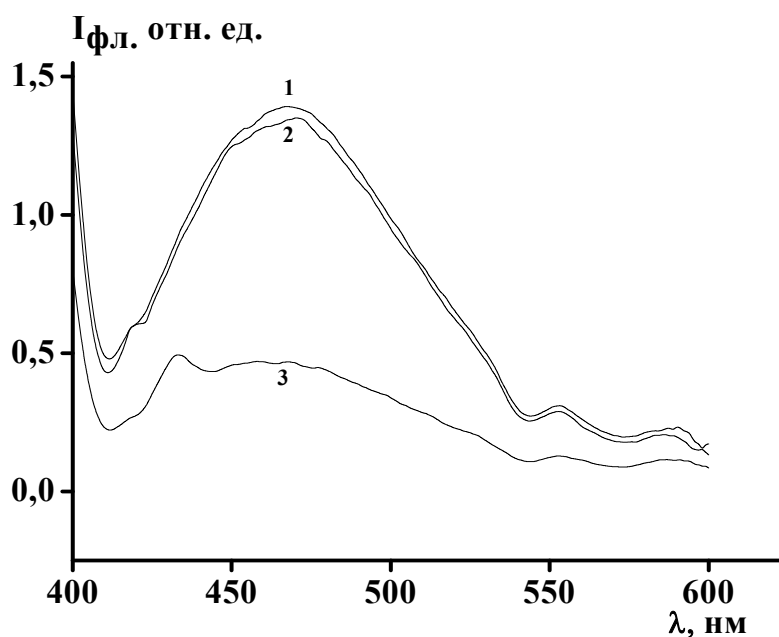


Рисунок 4. Спектры флуоресценции ДИДС, встроенного в мембраны, изолированные из эритроцитов до и после воздействия амилоидных фибрилл. Условия инкубации суспензии эритроцитов: 1 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4 (контроль); 2 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем 10 мг/мл лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10% -ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl+ 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере ($\lambda_{возб}=365$ нм)

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, воздействуя на эритроциты человека *in vitro*, вызывают модификацию структурного состояния их мембран, проявляющуюся в повышении отделения от эритроцитов части мембранного материала – микровезикул, снижении уровня белковых SH-групп и модификации структурного состояния белка полосы 3.

Список литературы / References

1. Шавловский М.М. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов. *Медицинский академический журнал*, 2010, т. 10, № 4, с. 63-81. [Schavlovsky M.M. Etiology and pathogenesis of amyloidosis: the molecular and genetic basis. *Med. Acad. Journ.*, 2010, vol. 10, no. 4, pp. 63-81. (In Russ.)]
2. Chiti F., Dobson C. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, vol. 86, pp. 27-68.
3. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V., Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Adv Protein Chem Struct Biol.*, 2011, vol. 84, pp. 63-111.
4. Zou Y., Hao W., Li H., Gao Y., Sun Y., Ma G. New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach. *J. Phys. Chem. B*, 2014, vol. 118, no. 33, pp. 9834-9843.
5. Fazili N.A., Bhat I.A., Bhat W.F., Naeem A. Anti-fibrillation propensity of a flavonoid baicalein against the fibrils of hen egg white lysozyme: potential therapeutics for lysozyme amyloidosis. *J Biomol Struct Dyn.*, 2016, vol. 34, no. 10, pp. 2102-14.
6. Dodge G.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, vol. 100, pp. 119-130.
7. Markwell M.A., Haas S.M., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample. *Analyt. Biochem.*, 1978, vol. 87, no. 2, pp. 206-210.
8. Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И., Козарезова Т.И., Климович Н.Н. Процессы микровезикуляции эритроцитов у детей при гематологических заболеваниях. *Новости медико-биол. наук*, 2004, № 1, с. 143-146. [Zubritskaya G.P., Lukyanenko L.M., Slobozhanina E.I., Kozarezova T.I., Klimovich N.N. Microvesicular process in erythrocytes of children with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *News of biomedical sciences*, 2004, no. 1, pp. 143-146. (In Russ.)]
9. LeVine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 1993, vol. 2, no. 3, pp. 404-410.

THE EFFECT OF AMYLOID FIBRILS FROM HEN EGG WHITE LYSOZYME ON THE MEMBRANE PROTEINS MODIFICATION OF HUMAN ERYTHROCYTES *IN VITRO*

Venskaya E.I., Zubritskaya G.P., Lukyanenko L.M., Slobozhanina E.I.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus

Academicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus; e-mail: e.i.rusina@mail.ru

Abstract. The effect of amyloid fibrils on the structural and functional state of human erythrocyte membranes *in vitro* was studied. The process of the formation of amyloid fibrils from hen egg lysozyme was monitored by the fluorescence method with a specific thioflavin T probe. Experiments were carried out on the blood erythrocytes of virtually healthy donors. Cells were incubated in a solution containing amyloid fibrils, then erythrocyte membranes were isolated from the cells. The structure of human erythrocyte membranes was estimated by the degree of cell vesiculation under metabolic depletion, protein modification of erythrocyte membranes was assessed by the fluorescence parameters of N- (1-pyrene) maleimide (PM) probes, reflecting the level of sulfhydryl groups, and 4-4', -diacetamide 2,2', -stilbendisulphonate (DIDS), specifically binding to protein of lane 3. Erythrocytes incubated under the same conditions in medium containing intact lysozyme, as well as in medium devoid of protein components were used as the controls. A three-hour incubation of cells in a solution containing amyloid fibrils from lysozyme was found to accelerate the erythrocyte vesiculation process upon their metabolic depletion, decrease the fluorescence intensity of the protein SH-groups-specific N-1- (pyrene) maleimide and lane 3 protein associated 4-4', -diacetamido-2,2', -stilbendisulphonate, compared with control cells. The results allow us to conclude that amyloid fibrils obtained from lysozyme, when acting upon human erythrocytes *in vitro*, cause a modification of their membrane structure, which manifests in an increase in the separation of the membrane material from the red blood cells - vesicles, a decrease in the level of protein SH-groups and modification of the lane 3 protein structure in human erythrocyte membranes.

Key words: erythrocytes, amyloid fibrils, lysozyme, membrane proteins.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИФФУЗИИ КАТЕХОЛАМИНОВ В ГИДРОГЕЛЕВЫХ СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

Гильфанов Р.М.¹, Черенков И.А.^{1,2}, Сергеев В.Г.^{1,2}, Иванова И.Л.²

¹ Удмуртский государственный университет

ул. Университетская, 1, г. Ижевск, 426034, РФ; e-mail: ivch75@yandex.ru

² Ижевская государственная медицинская академия

ул. Коммунаров, 246, г. Ижевск, 426034, РФ

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. В работе рассмотрено электрохимическое поведение адреналина и дофамина в гидрогелевых средах на основе гуаровой камеди и полиакриламида с использованием графитовых электродов, модифицированных поли(толуидиновым синим). Методом циклической вольтамперометрии проведена оценка диффузии катехоламинов в гидрогелях различного состава. Обнаружено, что исследованные гелеобразователи существенно влияют на электрохимические превращения в системе «поли(толуидиновый синий)-катехоламины». Показано, что результирующие характеристики ЦВА определяются не только электрохимическими превращениями адреналина и дофамина на поверхности электрода, но и физико-химическими свойствами гидрогелеобразователя. Отмечено микроконцентрирующее действие гидрогеля, что в ряде случаев позволяет регистрировать пиковые значения силы тока в несколько раз выше, чем в водной среде. Присутствие на электроде гидрогеля способствует более полной регистрации редокс-превращений катехоламинов и их метаболитов. Адреналин и дофамин обладают разными диффузионными и адсорбционными свойствами в отношении гуаровой камеди и полиакриламида, что отражается количественными и качественными различиями кривых ЦВА.

Ключевые слова: адреналин, дофамин, поли(толуидиновый синий), гуаровая камедь, полиакриламид, циклическая вольтамперометрия.

Катехоламины являются редокс-активными соединениями, окислительно-восстановительные превращения которых играют важную роль, как в физиологических условиях, так и при развитии ряда патологических процессов [1, 2]. Предложено широкое разнообразие электрохимических детекторов дофамина и адреналина, использующих различные способы получения аналитического сигнала [3-6]. Перспективным подходом признается применение электродов, модифицированных электроактивными полимерами [4,7]. В этом случае в качестве химического сенсора выступает система «электроактивный полимер-электрод», что позволяет повысить чувствительность и специфичность определения и, в перспективе, снизить стоимость датчика.

С точки зрения фундаментальных исследования биологических процессов большой интерес представляют электрохимические модели с использованием гидрогелевых сред, поскольку диффузионные ограничения, возникающие в таких условиях, способны существенно влиять на результирующий электрохимический сигнал [8-10]. При этом условия гидрогелевой среды наиболее соответствуют процессам, происходящим в клетках и тканях. Существует и практический аспект – гелеобразователи применяются как носители лекарственных средств [11], и электрохимические техники исследования катехоламинов и родственных им соединений могут быть использованы для обоснованного выбора гелевого носителя, оценки качества препаратов с точки зрения диффузионной подвижности действующего вещества, а в перспективе – для мониторинга и управления его выделением.

Целью настоящей работы стало электрохимическое исследование диффузии дофамина и адреналина в гидрогелях на основе модифицированной гуаровой камеди (*Esqflor HM22*) и полиакриламида, модифицированного катионными радикалами (*Rheovis CSP*), на планарном графитовом электроде, покрытом поли(толуидиновым синим) (полиТС).

Для регистрации вольтамперограмм и получения электроактивного полимера использовали потенциостат-микроамперметр «Эколаб-2А-100» (ООО «Эковектор», Россия, Ижевск). Электрополимеризацию проводили по известным методикам [12, 13], используя в качестве основы планарные графитовые электроды (ООО «Автоком», Россия, Москва). После электрополимеризации оценивали остаточную активность полимера в среде фосфатно-солевого буфера. Измерения проводили в диапазоне потенциалов +600...–600 мВ, скорость развертки – 90 мВ/с, 4 цикла. Полученные данные использовали как фоновые показатели в серии экспериментов с адреналином и дофамином. Для анализа электрохимического поведения катехоламинов использовали диапазон потенциалов -1200...+900 мВ. В ячейку вносили дофамин и адреналин до конечной концентрации 1 мМ. Все значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода.

ПолиТС характеризуется хорошо воспроизводимым окислительно-восстановительным поведением близким к обратимому. На ЦВА это отражается формированием характерных пиков, которые сохраняются при внесении в ячейку адреналина (рис. 1а). По прошествии 60 минут происходит почти двукратное увеличение обратимых пиков восстановления и окисления в диапазоне потенциалов $E_{pa} = +200$ мВ до $E_{pk} = -200$ мВ. Адреналин, вероятно, вступает во взаимодействие с полиТС, усиливая его электрохимические превращения. Гелевая среда формирует диффузионные ограничения, обеспечивая рост силы тока во времени.

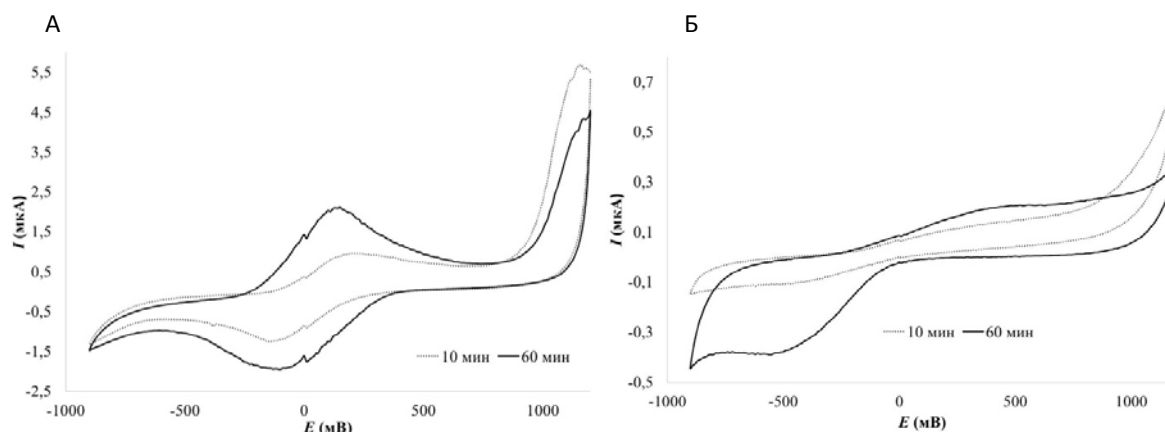


Рисунок 1. Циклическая вольтамперограмма модифицированного полиТС графитового электрода с гелевой подложкой на основе гуаровой камеди (*Esafloor HM22*) в среде: А – фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего адреналин, Б – фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего дофамин

При этом на ЦВА адреналина и дофамина на модифицированном электроде по прошествии 60 минут при потенциале $E_{pa} = +1200$ мВ происходит падение значений тока с $I_0 = 5,6$ до $I_{60} = 4,3$ в случае с адреналином, и с $I_0 = 0,8$ до $I_{60} = 0,4$ мкА в случае с дофамином.

Внесение дофамина приводит к вырождению пиков окисления-восстановления полиТС (рис. 16). При использовании гелевой подложки из гуаровой камеди (*Esafloor HM22*) обнаружено появление новых катодных и анодных пиков на вольтамперной кривой дофамина: небольшой анодный пик при потенциале $E_{pa} = +500$ мВ и катодный пик при потенциале $E_{pk} = -540$ мВ, которые могут соответствовать реакциям окисления дофамина до дофамин-орто-хинона, а затем частичного его восстановления до дофамина, опосредуемых полиТС.

Использование полиакриламида в качестве гелеобразователя на поверхности модифицированного полиТС графитового электрода при электрохимическом исследовании адреналина позволяет регистрировать многоэтапный процесс его окислительных превращений (рис. 2А). Использование других сред не позволяло нам так полно фиксировать данный процесс.

Характерный анодный пик при потенциале $E_{pa} = +260$ мВ достигает значение силы тока $I = +0,9$ мкА и, вероятно, соотносится с процессом окисления дегидроадреналина до адренохрома, опосредованного полиТС. Также на вольтамперной кривой появляются два катодных пика: пик восстановления при потенциале $E_{pk} = -140$ мВ и пик при потенциале $E_{pk} = -280$ мВ. Можно предположить, что первый пик соответствует восстановлению адренохрома в лейкоадренохром, а второй – восстановлению оксоадренохрома в лейкооксоадренохром.

При этом стоит отметить, что вольтамперные кривые адреналина не показывают каких-либо значительных изменений во времени. Вероятно, полиакриламидный гель обладает лучшей диффузионной проницаемостью для адреналина, чем камедь.

При анализе дофамина (рис 2Б) по прошествии 60 минут отмечено образование отчетливо выраженного анодного пика при потенциале $E_{pa} = +180$ мВ, ток в данной области растет: $I_0 = 0,11$; $I_{60} = 0,9$ мкА. При использовании других гелеобразователей в данной области потенциалов при внесении в систему дофамина мы не фиксировали окислительно-восстановительных превращений. Можно предположить, что полиакриламид *Rheovis CSP*, благодаря катионным свойствам, позволяет выявить одну из окислительных реакций метаболитов дофамина в данной области потенциалов.

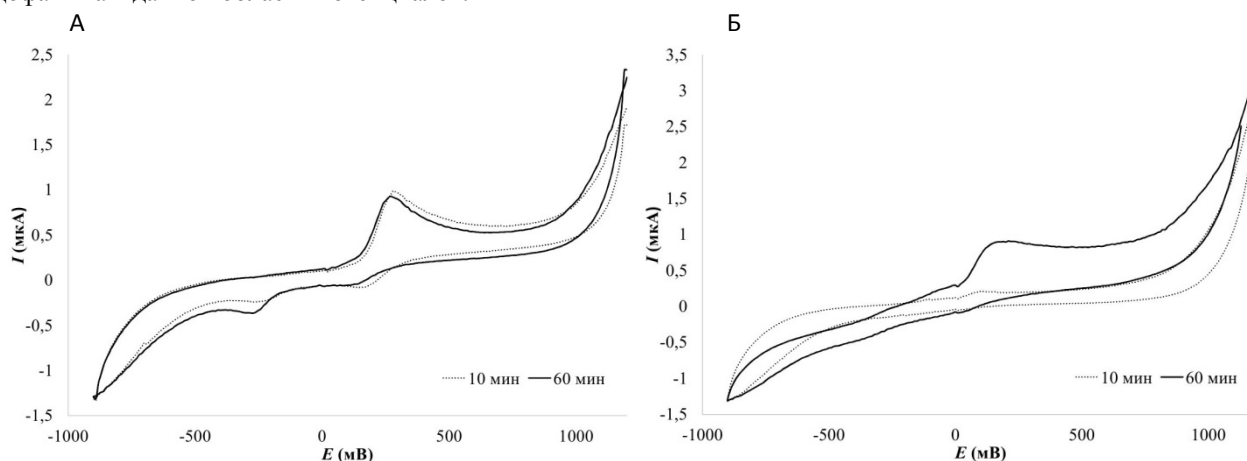


Рисунок 2. Циклическая вольтамперограмма модифицированного поли(ТС) графитового электрода с гелевой подложкой на основе полиакриламида (*Rheovis CSP*) в среде: А – фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего адреналин, Б – фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего дофамин

Таким образом, наиболее выраженные диффузионные процессы, как для адреналина, так и для дофамина зафиксированы в среде гидрогеля на основе гуаровой камеди. Они сопровождаются ростом пиковых токов во времени. В этом гидрогеле наибольшее влияние на окислительно-восстановительные свойства полиТС оказывает дофамин, качественно изменяя характер кривых ЦВА. Гидрогель на основе акриламида, по-видимому, накладывает меньшие диффузионные ограничения на электрохимическое поведение адреналина, позволяя при этом более детально исследовать его последовательные окислительно-восстановительные превращения. Вольтамперные кривые ЦВА, в исследованных гидрогелях, различны для адреналина и дофамина.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-015-00177.

Список литературы / References:

1. Сирота Т.В. Участие карбонат/бикарбонатных ионов в супероксидгенирующей реакции автоокисления адреналина. *Биомедицинская химия*, 2015, т. 61, № 1, с. 115-124. [Sirota T.V. Involvement of carbonate/bicarbonate ions in the superoxide-generating reaction of adrenaline autoxidation. *Biomedicinskaya himiya*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 115-124. (In Russ.)]
2. Сирота Т.В. Действие ионов металлов с постоянной валентностью на свободнорадикальный процесс автоокисления адреналина. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 1, с. 22-27. [Sirota T.V. Effect of Metal Ions with Fixed Valence on Free Radical Process of Adrenaline Autoxidation. *Biofizika*, vol. 61, no. 1, pp. 22-27 (In Russ.)]
3. Rekha B., Swamy B.E.K., Ganesh P.S. Poly(amoxicillin) Modified Carbon Paste Electrode for the Determination of Dopamine: A Cyclic Voltammetric Study. *Anal. Bioanal. Electrochem.*, 2016, vol. 8, № 2, pp. 184-192.
4. Lavanya M., Reddy Y.V.M., Sundupalle K., Venu M. Madhavi G. Selective Determination of Dopamine in Presence of Ascorbic Acid by using Triton X-100 Poly(Safranin) Modified Carbon Paste Electrode. *Anal. Bioanal. Electrochem.*, 2015, vol. 7, no. 5, pp. 555-568.
5. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании реакции автоокисления адреналина: возможность полярографического определения активности супероксиддисмутазы и антиоксидантных свойств различных препаратов. *Биомедицинская химия*. 2012, т. 58, № 1, с. 77-87. [Sirota T.V. A new approach to studying the autoxidation of adrenaline: possibility of the determination of superoxide dismutase activity and the antioxidant properties of various preparations by polarography. *Biomedicinskaya himiya*, 2012, vol. 58, no. 1, pp. 77-87. (In Russ.)]
6. Cuadrado C., Ibarra L., Hurtado J., García-Beltrán O., Nagles E. Electrochemical sensors for dopamine using graphene-cobalt(II) complex modified glassy carbon electrode by adsorptive voltammetry. *Anal. Bioanal. Electrochem.*, 2016, vol. 8, no. 7, pp. 910-921.
7. Narayana P.V., Reddy T.M., Gopal P., Raghu P., Reddaiah K., Srinivasulu M. Development of Trypan Blue Polymer Film Based Electrochemical Sensor for the Determination of Dopamine and its Simultaneous Detection in Presence of Ascorbic Acid and Uric acid: A Voltammetric Method. *Anal. Bioanal. Electrochem.*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 450-460.
8. Черенков И.А. Раевских К.С., Сергеев В.Г., Кривилев М.Д. Моделирование протеазной активности с использованием электрохимического интерфейса. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2018, т. 3, № 2, с. 422-426. [Cherenkov I.A. Raevskih K.S., Sergeev V.G., Krivilev M.D. Modeling protease activity using the electrochemical interface. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*. 2018, vol. 3, no. 2, pp. 422-426. (In Russ.)]
9. Черенков И.А., Кропачева Т.Н., Перевозчиков Е.А., Сергеев В.Г. Электрохимическая оценка метаболической активности клеток родококков, иммобилизованных на планарном графитовом электроде. *Технологии живых систем*, 2015, т. 12, № 2, с. 12-19. [Cherenkov I.A. Kropacheva T.N. Perevozchikov E.A. Sergeev V.G. Electrochemical assessment of metabolic activity of rhodococcal cells immobilized on planar graphite electrode. *Tekhnologii zhiyih sistem*, 2015, vol. 12, no 2, pp. 12-19. (In Russ.)]
10. Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochim. Acta*, 2012, vol. 76, pp. 43-47.
11. Скоромец А.А., Одинак М.М., Якупов Э.З., Литвиненко И.В., Залялова З.А., Тимофеева А.А., Киртаев С.Ю., Богданов Р.Р., Агафина А.С., Chatamra K., Робисон В., Бенеш Дж., Латыпова Г.Р., Ершова М.В., Иллариошкин С.Н. Леводopa-карбидopa интестинальный гель в терапии больных с развернутыми стадиями болезни Паркинсона: результаты 12-месячного открытого исследования. *Журнал неврологии и психиатрии*, 2017, № 2, С. 22-31. [Skoromec A.A., Odinak M.M., Yakupov E.Z., Litvinenko I.V., Zalyalova Z.A., Timofeeva A.A., Kirtaev S.Yu., Bogdanov R.R., Agafina A.S., Chatamra K., Robieson W., Benesh J., Latypova G.R., Ershova M.V., Illarioshkin S.N. Levodopa-carbidopa intestinal gel in the treatment of patients with Parkinson disease: results of a 12-month open study. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2017, no. 2, pp. 22-31]
12. Karyakin A.A., Karyakina, E.E., Schmidt H.-L. Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers. *Electroanalysis*, 1999, vol. 11, no. 3, pp. 93-110.
13. Barsan M.M., Pinto E.M., Brett C.M.A. Methylene blue and neutral red electropolymerisation on AuQCM and on modified AuQCM electrodes: an electrochemical and gravimetric study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. vol. 13, no. 12, pp. 5462-5471.

ELECTROCHEMICAL MODELING DIFFUSION OF CATECHOLAMINES IN DIFFERENT COMPOSITION OF HYDROGEL MEDIA**Gil'fanov R.M.¹, Cherenkov I.A.^{1,2}, Sergeev V.G.^{1,2}, Ivanova I.L.²**¹ Udmurt State University*Universitetskaya str., 1, Izhevsk, 426034, Russia; e-mail: ivch75@yandex.ru*² Izhevsk State Medical Academy*Kommunarov str., 246, Izhevsk, 426034, Russia*

Abstract. Electrochemical behavior of adrenaline and dopamine in hydrogel guar gum and polyacrylamide media was shown in the research. Graphite electrodes modified by (poly)toluidine blue were used. We evaluated diffusion of catecholamines in hydrogels using cyclic voltammetry (CVA) method. It was identified interaction between the hydrogel medium and a system "dye-a catecholamine". It was shown that physical and chemical properties of hydrogel affect the characteristics of cyclic voltammetry as well as the electrochemical transformations of adrenaline and dopamine. It was marked microconcentric action of the hydrogel. In some cases it allows to record higher peak value of the current than in the aquatic environment. The presence of hydrogel on the electrode contributes to a more complete registration of redox transformations of catecholamines and their metabolites. The CVA curves have quantitative and qualitative differences because of different diffusion and adsorption properties of adrenaline and dopamine in such medium.

Key words: *adrenaline, dopamine, poly (toluidine blue), guar gum, polyacrylamide, cyclic voltammetry.*

ТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКИХ ВОЗБУЖДЁННЫХ СОСТОЯНИЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ**Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Пашкевич С.Н.**

Оренбургский государственный университет

пр. Победы, 13, г. Оренбург, 460018, РФ, azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Рассматривается механизм инактивации планктонных микроорганизмов ударными акустическими волнами. Ударные волны возникают при очень быстром образовании и схлопывании пузырьков пара в жидкости, локально нагретой до температуры, превышающей порог кипения. Локальный нагрев осуществлялся импульсным лазерным излучением с помощью органических фототермических сенсibilизаторов. Эффективный фототермический сенсibilизатор должен иметь очень короткое время жизни (пикосекунды) возбужденных состояний. Таким условиям удовлетворяют высоковозбужденные электронные состояния (ВВЭС) органических красителей. ВВЭС красителей заселялись путем ступенчатого поглощения молекулой двух квантов падающего излучения через нижние возбужденные уровни. Возникновение и исчезновение пузырьков пара исследовано по кинетике светорассеяния низкоинтенсивного зондирующего луча гелий-неонового лазера.

Ключевые слова: высокие электронно-возбуждённые состояния молекул, локальный нагрев, ударные волны, инактивация микроорганизмов.

Распространение штаммов микроорганизмов, устойчивых к традиционной лекарственной химиотерапии, делает актуальным поиск альтернативных способов борьбы с патогенами [1-3]. Разрабатываемые противомикробные стратегии должны быть безопасными, быстродействующими, эффективными и минимизирующими резистентность бактерий.

Известны способы воздействия на живые микроорганизмы – фотодинамическая и фототермическая обработка [1-8], предполагающие облучение бактерий светом в присутствии сенсibilизаторов. Повреждающее действие на микробы могут оказывать как фотодинамические продукты (включая активные формы кислорода), так и чисто физические факторы - гипертермия или механическое действие образуемых при нагреве ударных волн. Тепловое действие сенсibilизаторов особенно актуально в средах с ограниченным содержанием кислорода; классический пример – бактериальные плёнки, образуемые в анаэробных условиях. Даже в плёнках, образующихся при нормальном атмосферном давлении, аэрирован только поверхностный слой, в глубинных слоях плёнки активные формы кислорода малоэффективны [3, 4].

В качестве фотосенсibilизаторов (ФС), способных генерировать и фотодинамические продукты, и тепло, можно использовать органические красители. При этом тепловыделение будет эффективным только у сенсibilизаторов с очень коротким временем жизни (1-10 пс) возбужденных состояний, когда основной канал релаксации – безызлучательная внутренняя конверсия. Такими свойствами обладают высокие возбуждённые электронные состояния (ВВЭС) молекул [9, 10]. Для заселения ВВЭС молекул требуется импульсная накачка излучением высокой плотности мощности. При таком возбуждении значительная доля поглощаемой энергии неизбежно трансформируется через ВВЭС молекул. Энергообмен с окружением в ходе релаксации ВВЭС красителей, в свою очередь, инициирует физико-химические процессы, влияющие на жизнеспособность микроорганизмов. Некоторые результаты фотоинактивации микроорганизмов в реакциях с участием ВВЭС молекул красителей представлены в настоящей статье.

Исследованы планктонные культуры грамотрицательных и грамположительных палочковидных бактерий *Escherichia coli* и *Bacillales subtilis* в физрастворе (10^7 КОЕ/мл) при нормальных условиях. В качестве теплосенсibilизаторов использовались анионные ксантеновые красители эритрозин и эозин, а также катионный краситель родамин 6Ж (концентрация 0,01-0,5 мМ). Источником возбуждения служил YAG:Nd лазер (вторая гармоника, 532 нм), работающий в импульсном режиме (длительность импульса 15 нс, плотность мощности возбуждения (0,1-30) МВт/см²). Информацию о релаксации возбужденных состояний ФС получали по кинетике их замедленной флуоресценции и фосфоресценции, которые регистрировали с помощью ФЭУ-84 через монохроматор МДР-41. Повреждения бактерий оценивали путём подсчёта колониеобразующих единиц и визуализации с использованием атомно-силового микроскопа.

Дополнительные сведения о процессах в растворах, содержащих бактерии и ФС, при воздействии на них интенсивным (свыше 10 МВт/см²) возбуждающим светом, получали по рассеянию зондирующего излучения гелий-неонового (He-Ne) лазера. С помощью цилиндрической линзы в кювете с исследуемым раствором формировалась узкая протяжённая (0,3·10 мм²) зона возбуждения. Вдоль нее пропусклся зондирующий луч He-Ne лазера диаметром 1 мм. Нерассеянная часть этого луча блокировалась 3 мм экраном в непосредственной близости от сферической линзы, собирающей рассеянное излучение на входной щели монохроматора. Кинетика изменения интенсивности рассеянного света измерялась с помощью ФЭУ.

Установлено, что эффективность сенсibilизаторов зависит от характера их взаимодействия с клеточной стенкой, в частности, грам-положительные бактерии *B. subtilis* поражались эффективнее, чем *E.coli*, что согласуется с литературными данными [11, 12].

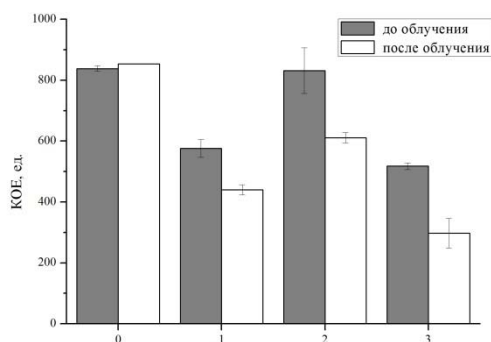


Рисунок 1. Гистограммы КОЕ клеток *Escherichia coli* до и после облучения растворов светом длины волны $\lambda = 532$ нм плотности мощности 20 МВт/см² без красителей (0) и в присутствии красителей концентрации 0,5 мМ: 1 – эритрозин, 2 – эозин, 3 – родамин 6Ж

Вместе с тем, обнаружено, что при равной дозе облучения, антимикробное действие существенно усиливалось если плотность мощности возбуждения превышала 10 МВт/см². С ростом интенсивности возбуждения эффективность повреждения грам-отрицательных бактерий *E.coli* увеличивалась в присутствии как катионных, так и анионных красителей.

На рисунке 1 представлены гистограммы КОЕ *Escherichia coli* после облучения светом длины волны $\lambda = 532$ нм плотности мощности 20 МВт/см².

Видно, что все исследованные красители проявляют противомикробную активность, что также подтверждается результатами, полученными с помощью атомно-силовой микроскопии.

Ксантоновые сенсibilизаторы обладают большим выходом в триплетное состояние и с высокой эффективностью генерируют активные формы кислорода [1-5]. Однако обращает на себя внимание то, что эозин, имея выход в триплетное состояние почти на 30% меньше, чем эритрозин, в условиях наших экспериментов оказывает фотодинамическое действие не меньшее, чем эритрозин. «Нефотодинамический» родамин 6Ж в физрастворе имеет выход в триплетное состояние всего около 0,01 и практически не производит активных форм кислорода, при этом его противомикробное действие выше, чем у ксантоновых красителей. Отсюда следует, что фотоинактивация бактерий осуществляется не только через фотодинамическое действие, но и по другому механизму. Мы полагаем, что гибель микроорганизмов связана с генерацией ударных акустических волн при релаксации ВВЭС молекул красителей.

На рисунке 2 представлена зависимость интенсивности флуоресценции эозина ($c = 0,1$ мМ) в физрастворе от плотности мощности возбуждающего излучения длины волны $\lambda = 532$ нм. При увеличении мощности падающего света интенсивность флуоресценции красителя очень быстро нарастает (участок в диапазоне 1÷5 МВт/см²), достигая насыщения, что связано с выходом на насыщение заселенности T_1 состояний молекул, образовавшихся в результате интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$. При дальнейшем повышении плотности мощности возбуждающего излучения интенсивность флуоресценции эозина начинает вновь заметно увеличиваться. Это указывает на двухквантовый характер образования триплетных состояний молекул в результате последовательных переходов $S_1 \rightarrow S_n \rightarrow T_m \rightarrow T_1$, т.е. с ростом плотности мощности возбуждения эффективно заселяются ВВЭС молекул.

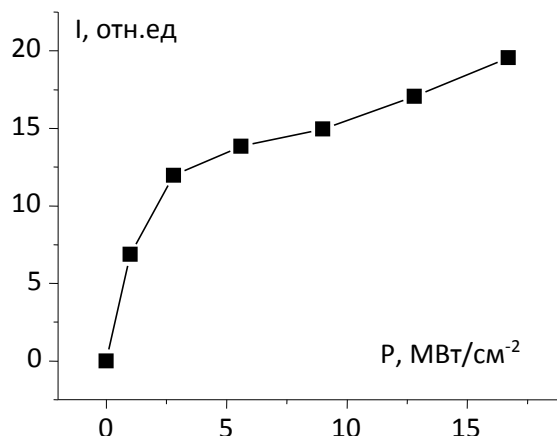


Рисунок 2. Зависимость интенсивности флуоресценции эозина ($c = 0,1$ мМ) в физрастворе от плотности мощности возбуждающего излучения длины волны $\lambda = 532$ нм

Релаксация ВВЭС молекул возможна по одному из следующих каналов [9]: излучение (флуоресценция); интеркомбинационная синглет-триплетная $S_n \rightarrow T_m$ или обратная триплет-синглетная $T_m \rightarrow S_k$ конверсия; безызлучательная внутренняя конверсия; фотохимическая реакция; перенос энергии на молекулы окружения.

Безызлучательная релаксация ВВЭС состояний молекул в среде сопровождается выделением тепла. Учитывая крайне малое время жизни таких состояний молекул, их можно рассматривать как мгновенные точечные источники. Ввиду большой удельной теплоемкости среды маловероятно ожидать, что при релаксации ВВЭС одной молекулы локальная температура растворителя заметно изменится. Однако в растворе с бактериями распределение молекул красителя неравномерно: в пространстве между бактериями или непосредственно на поверхности клеточных стенок могут сосредоточиться группы молекул. Если одиночная молекула не способна произвести ощутимого количества тепла, то конгломераты тесно расположенных молекул уже могут вызвать нагрев микроскопических областей, достаточный для воздействия на микроорганизмы.

В результате безызлучательной релаксации ВВЭС каждый ФС при однократном поглощении кванта света длиной волны 532 нм будет выделять количество теплоты, равное энергии $h\nu$ этого кванта. Если принять, что это тепло мгновенно усваивается сферой среды радиуса r , то можно оценить изменение температуры этой сферы:

$$h\nu = \frac{4}{3}\pi r^3 C \rho \Delta T$$

В наших экспериментах использовались растворы концентрацией $C = (0,1-0,5)$ мМ. Поскольку количество квантов возбуждающего излучения примерно в 10^6 раз больше, чем количество молекул красителя в облучаемом объеме, можно считать, что возбуждаются *все* молекулы в растворе. При плотности мощности выше 15 МВт/см² ВВЭС заселяются с высокой эффективностью. Кроме того, следует учитывать и длительность возбуждающего импульса. Поскольку длительность возбуждающего импульса составляла около 15 нс, акты поглощения квантов возбуждения и последующей релаксации могут происходить в молекулах неоднократно, каждый раз сопровождаясь тепловыделением.

Реальный размер зоны нагрева зависит от термодинамических свойств среды. Используя типичные значения термодинамических параметров $C \sim 4 \cdot 10^3$ Дж/(кг·К) и $\rho \sim 10^3$ кг/м³, можно приблизительно оценить уровень такого нагрева. Если принять радиус разогреваемой сферы 10 нм, то одиночные молекулы красителя «остывают» за около 10^{-8} с. Для сферы радиуса 10 нм величина ΔT не выше 10 К, однако уже для радиуса 1 нм ΔT превышает 100 К. Оценки времени остывания локально разогретых областей среды приведены в [9, 10]. Выделяющегося за короткое время тепла вполне достаточно для испарения воды и возникновения в растворе пузырьков. Образование и схлопывание пузырьков порождает ударные волны, которые, распространяясь в среде, могут механически повреждать компоненты клеточных мембран [6-8].

Кинетика возникновения и исчезновения пузырьков в растворах исследована по рассеянию света гелий-неонового лазера. На рисунке 3 представлены типичные кинетические кривые изменения интенсивности зондирующего луча, проходящего через кювету с эритрозином концентрацией 0.1 мМ в физрастворе при различной интенсивности возбуждения красителя. При малой плотности мощности возбуждения (до 5 МВт/см²) интенсивность рассеянного света после возбуждения ФС убывает, а затем восстанавливается за несколько микросекунд. Это обусловлено тем, что при одноквантовом возбуждении в результате $S_1 \rightarrow T_1$ процесса образуются возбужденные триплетные состояния и появляется наведенное триплет-триплетное $T_1 \rightarrow T_m$ поглощение. Этот сигнал убывает за несколько микросекунд, что соответствует времени жизни T_1 состояний красителя в растворах при нормальных условиях.

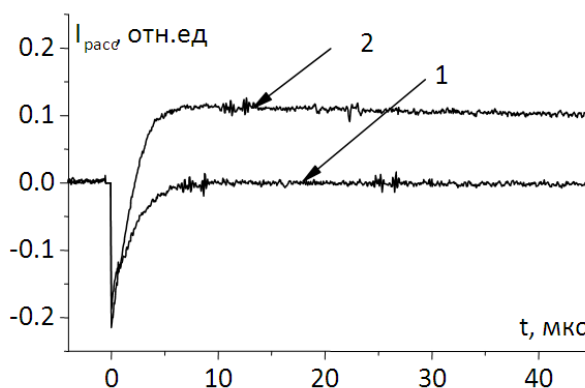


Рисунок 3. Кинетические кривые изменения интенсивности рассеянного света от луча He-Ne лазера, проходящего через кювету с эритрозином концентрацией 0.1 мМ в физрастворе при различной интенсивности возбуждения красителя: 1 – 5 МВт/см²; 2 – 30 МВт/см²

При высокой плотности мощности возбуждения (выше 15 МВт/см²) характер рассеяния существенно меняется: интенсивность рассеянного света растёт, а время релаксации увеличивается вплоть до нескольких миллисекунд, что значительно превышает время тепловой релаксации. Увеличение интенсивности рассеяния, по нашему мнению, обусловлено возникновением пузырьков в локально разогретых областях среды, при релаксации ВВЭС молекул красителей.

Наряду с разрушением бактерий ударными волнами возможны и другие механизмы деструкции микроорганизмов. Так возможна прямая гипертермия бактерий в результате тепловыделения при релаксации ВВЭС красителя. Необходимым условием для данного механизма является локализация сенсibilизатора в критически уязвимых локусах бактериальных клеток.

В основе другого механизма фотодеструкции микроорганизмов лежит безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения с ВВЭС красителя на молекулы мембраны. При заселении ВВЭС молекул путем ступенчатого возбуждения двумя квантами света через нижнее синглетное состояние достигается энергия около 5 эВ. Такой энергии достаточно для разрыва любой химической связи.

Наконец, еще один возможный канал фотоинактивации бактерий – фотохимические реакции с участием ВВЭС молекул. Такие реакции должны сопровождаться изменениями кинетики затухания люминесценции красителя, а также появлением новых полос в спектрах люминесценции и поглощения, так как имеют место структурные изменения молекулы. Нам не удалось обнаружить новых полос в спектрах люминесценции и поглощения, а также изменений кинетики затухания длительной люминесценции ФС, в связи с чем, можно утверждать, что вклад фотохимических реакций в наблюдаемые процессы пренебрежимо мал.

Обнаруженное повреждение бактерий ударными волнами, генерируемыми в среде тепловыми источниками указывает, что предварительное связывание сенсibilизатора с бактериальными стенками или их проникновение внутрь бактериальных клеток, не являются обязательным условием для их фотоинактивации. Органические красители можно использовать *in vivo*, где применение других теплосенсibilизаторов (например, наночастиц) ограничено из-за их токсичности. Полученные результаты могут быть полезны при разработке фотодинамических методов инактивации микроорганизмов.

Список литературы / References:

1. Baptista P.V. et al. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria – “A Battle of the Titans”. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, p. 1441. DOI: fmicb.2018.01441.
2. Kashef N., Huang Y., Hamblin M.R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. Review article. *Nanophotonics*, 2017, vol. 6(5), pp. 853-879. DOI: 10.1515/nanoph-2016-0189.
3. Ghorbani J., Rahban D., Aghamiri Sh., Teymouri A., Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.*, 2018, vol. 27(4), pp. 293-302. DOI: 10.5978/islsm.27_18-RA-01.
4. Yao Liu Y., Qin R., Zaat S.A.J., Breukink E., Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J Clin Transl Res*, 2015, vol. 1(3), pp. 140-167.
5. Hessling M., Spellerberg B., Hoenes K. Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths - a review on existing data. *FEMS Microbiol Lett.*, 2017, vol. 364(2). DOI: 10.1093/femsle/fnw270.
6. Budimir M. [et al.] Efficient capture and photothermal ablation of planktonic bacteria and biofilms using reduced graphene oxide–polyethyleneimine flexible nanoheaters. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, vol. 7, pp. 2771-2781.
7. Lapotko D. Pulsed photothermal heating of the media during bubble generation around gold nanoparticles. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2009, vol. 52, pp. 1540-1543. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2008.08.010.
8. Rout B., Liu C., Wu W. Photosensitizer in lipid nanoparticle: a nano-scaled approach to antibacterial function. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7. DOI: 10.1038/s41598-017-07444-w.
9. Лету́та С.Н., Лантух Ю.Д., Пашкевич С.Н. Релаксация высоких электронно-возбужденных состояний многоатомных молекул. Оренбург: изд-во ОГУ, 2016, 164 с. [Letuta S.N. *Relaxation of high-energy excited electronic states of polyatomic molecules*. Orenburg: OSU print., 2016, 164 p. (In Russ.)]
10. Кучеренко М.Г. Кинетика нелинейных фотопроцессов в конденсированных молекулярных системах. Оренбург: Изд-во ОГУ, 1997. [Kucherenko M.G. *Kinetics of non-linear photoprocesses in condensed molecular systems*. Orenburg: OSU print., 1997. (In Russ.)]
11. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B Biol.*, 1992, vol. 14(3), pp. 262-266. DOI: 10.1016/1011-1344(92)85104-3.
12. Jori G., Fabris C., Soncin M.S., Coppelotti O., Dei D. [et al.] Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.*, 2006, vol. 38(5), pp. 468-481. DOI: 10.1002/lsm.20361.

THERMAL INACTIVATION OF MICROORGANISMS USING HIGH EXCITED ELECTRONIC STATES OF PHOTSENSITIZERS

Ishemgulov A.T., Letuta S.N., Pashkevich S.N.

Orenburg State University

Pobedy av., 13, Orenburg, 460018, Russia, e-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Abstract. Mechanism of inactivation of plankton microorganisms by acoustic shock waves is discussed. Shock waves occur at very rapid formation and collapse of vapor bubbles in a liquid locally point heated to a temperature exceeding the boiling. Local heating was provided by pulsed laser excitation of organic photothermal sensitizers. An effective photothermal sensitizer should have a very short lifetime (picoseconds) of excited states. High excited electronic states (HEES) of organic dyes follow this requirement. HEES are produced as a result the stepwise absorption of two photons by the molecule through the lower excited states. The formation and disappearance of vapor bubbles in the solution was detected as a change in the light scattering of a low-intensity helium-neon laser beam passing through the cuvette.

Key words: *high excited electronic states of molecules, local heating, shock waves, inactivation of microorganisms.*

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЕРРОКИНЕТИКИ, ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ И КОНЦЕНТРАЦИИ ЛАКТОФЕРРИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДЕТЕЙ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ

Слобожанина Е.И.¹, Зубрицкая Г.П.¹, Климович Н.Н.², Венская Е.И.¹, Кутько А.Г.¹, Скоробогатова А.С.¹, Лукьяненко Л.М.¹, Козарезова Т.И.²

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, РБ; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»
ул. П. Бровки, 3, г. Минск, 220013, РБ; e-mail: det.hematology@mail.ru

Аннотация. Проведено исследование феррокинетики, общей антиоксидантной активности и концентрации лактоферрина в плазме крови у детей с железодефицитными состояниями (железодефицитной анемией и латентным дефицитом железа) в возрасте 0-17 лет до и после лечения. Обнаружено возрастание содержания ферритина (от 5,9 до 10,3 нг/мл) и железа (от 11,5 до 23,5 ммоль/л) сыворотки крови, а также снижение общей антиоксидантной активности плазмы крови детей подростковой группы с ЖДА после лечения ферропрепаратами по сравнению с данными пациентами до лечения (на 20%, $P < 0,05$). Показано, что при дефиците железа возрастает содержание лактоферрина в плазме крови с максимальным значением у детей в возрасте 0-3 месяца. На фоне ферротерапии концентрация лактоферрина также повышается по сравнению с соответствующими показателями до начала лечения. Полученные результаты указывают на необходимость учета уровня общей антиоксидантной активности плазмы крови детей с железодефицитными состояниями при назначении им терапии с использованием ферропрепаратов.

Ключевые слова: железодефицитные состояния, феррокинетика, общая антиоксидантная активность, лактоферрин, дети.

Биологическая ценность железа определяется многократностью его функций, незаменимостью другими металлами в сложных биохимических процессах, активным участием в клеточном дыхании, обеспечивающем нормальное функционирование клеток и тканей организма человека [1, 2]. Хотя железо находится на четвертом месте по обилию элементов в земной коре, его биодоступность для организма человека очень низкая, поэтому, несмотря на малую суточную потребность, нарушения гомеостаза железа являются одними из наиболее распространенных заболеваний человека в мире [1, 3]. Проблема железодефицитных состояний (ЖДС) давно привлекает внимание исследователей. По данным Всемирной организации здравоохранения дефицит железа различной степени выраженности встречается почти у 4 млрд человек, а железодефицитная анемия (ЖДА) – примерно у 2 млрд. Таким образом, ЖДА является наиболее распространенным заболеванием в мире и наиболее частой среди анемий (90%). Причем ЖДА страдают в основном дети и женщины репродуктивного возраста [4, 5].

Основными свойствами ЖДС являются их обратимость и возможность предупреждения. Для лечения и профилактики таких состояний необходимо увеличить потребление железа как за счет соблюдения соответствующей диеты, так и с помощью минеральных добавок. Однако в целом, полноценная и сбалансированная по основным ингредиентам диета позволяет лишь восполнить физиологическую потребность организма в железе, но не устранить его дефицит [1]. Целью терапии ЖДС является не только устранение дефицита железа, но и восстановление его запасов в организме. Это возможно только при устранении причины, лежащей в основе ЖДА, и одновременном возмещении дефицита железа в организме. При этом восстановить запасы железа без назначения лекарственных препаратов с содержанием данного элемента невозможно. Однако использование препаратов железа имеет ряд недостатков и ограничений, связанных, в первую очередь, с опасностью проявления токсичных свойств железа либо с проявлением негативных эффектов конкретной формы лекарственного вещества. Поэтому в современной медицине вопросы оптимизации коррекции дефицита железа являются предметом постоянных дискуссий. Кроме дефицита железа в основе неблагоприятных эффектов анемии может лежать комбинация таких факторов, как гипоксия, гиперволемия, нарушение окислительно-восстановительных реакций на митохондриальном уровне, белково-энергетическая недостаточность. В этом случае применение препаратов железа требует дифференциально-диагностического подхода во избежание неблагоприятных последствий. Вследствие указанных обстоятельств, точная оценка феррокинетики является сложной и актуальной задачей на сегодняшний день. Однако, применяющиеся в настоящее время лабораторные методы оценки дефицита железа (железо сыворотки, % насыщения трансферрина, ферритина), не в состоянии ответить на все выше обозначенные вопросы. Требуется дифференциальный подход к оценке феррокинетики с определением всех звеньев метаболизма железа и механизмов возникновения абсолютного и функционального дефицита железа в организме. Перспективным направлением коррекции дефицита железа в организме может служить природное железосодержащее вещество лактоферрин (ЛФ). Последний является одним из важнейших компонентов иммунной системы организма, принимает участие в работе системы неспецифического гуморального иммунитета. Защитные свойства ЛФ уникальны: он обладает антибактериальной, антивирусной активностью, а также антиканцерогенным,

антиаллергическим и иммуномоделирующими действиями. В литературе обсуждается вопрос о роли ЛФ в гомеостазе железа. Наличие у ЛФ способности прочно связывать железо, вместе с большой биодоступностью железа из грудного женского молока и высокой концентрацией в нем ЛФ, позволяет сделать предположение о возможной роли ЛФ в поглощении железа в кишечнике. Кроме того, специфические рецепторы для ЛФ были найдены на поверхности слизистой тонкого кишечника человека и животных [6]. Однако результаты исследований оказались противоречивыми, подтверждая роль ЛФ как в усилении, так и в снижении скорости переноса железа в кишечнике. Современные исследования выявили участие ЛФ в связывании железа и препятствии поглощения избыточного железа в кишечнике в процессе вскармливания [7-9]. Исследования, посвященные изучению метаболизма железа у детей в зависимости от содержания эндогенного ЛФ, единичны и не раскрывают возможности использования этого уникального полифункционального белка как диагностического теста в практике педиатра для оптимизации ферротерапии и для профилактики ЖДС. Требуется дифференциальный подход к оценке феррокинетике с определением всех звеньев метаболизма железа и механизмов возникновения абсолютного и функционального дефицита железа в организме. Также дифференциальный подход к оценке феррокинетике с учетом функции ЛФ может быть использован при анализе эффективности терапии с целью выбора оптимальных режимов ее проведения.

Целью данной работы явилась оценка показателей феррокинетике, общей антиоксидантной активности и концентрации эндогенного лактоферрина в плазме крови у детей с ЖДС до и на фоне ферротерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании проведен анализ клиничко - лабораторных данных 94 пациентов с ЖДС (21 пациент с ЖДА в возрасте 0-3 мес, 56 пациентов с ЖДА и 17 с латентным дефицитом железа (ЛДЖ) в возрасте от 0 до 17 лет). В качестве контроля использованы образцы периферической крови 14 практически здоровых детей (медиана возраста 12,4 лет). Образцы крови детей получены из ГУ «Республиканская детская больница медицинской реабилитации» и ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя». Забор периферической крови для исследования осуществлялся после подписания родителями пациента формы информированного согласия на участие в исследовании. Гемограмма и биохимический анализ крови выполнялись по стандартной методике в клиничко-диагностических лабораториях баз выполнения исследования. Дефицит железа расценивался как латентный при уровне ферритина сыворотки (СФ) менее возрастной нормы и нормальной концентрации гемоглобина. ЖДА верифицировалась при наличии анемии любой степени тяжести по данным гемограммы и при снижении содержания ферритина.

Измерение общей антиоксидантной активности (ОАА) плазмы крови проводили с помощью коммерческого набора Antioxidant assay kit (Cayman, США) согласно протоколу производителя. Перед исследованием плазму крови разводили в буфере для анализа антиоксидантов в соотношениях 1:20. Принцип анализа заключается в формировании феррил-миоглобин радикала из метмиоглобина и пероксида водорода, который окисляет АБТС (2,2-азино-бис 3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота), с образованием радикала АБТС^{•+} – растворимого хромогена, окрашенного в зеленый цвет. Его содержание определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм (D₄₀₅) на универсальном анализаторе VICTOR2™ (Perkin Elmer, США). Антиоксиданты подавляют продукцию радикала АБТС^{•+} концентрационно зависимым образом, и интенсивность окраски пропорционально снижается. Численное значение концентрации антиоксидантов в исследуемых образцах плазмы выражали по тролокс-эквиваленту антиоксидантной активности (ТЭАА), используя калибровочную кривую.

Концентрацию эндогенного ЛФ в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем для количественного определения ЛФ человека в биологических жидкостях (Elabscience), используя универсальный анализатор VICTOR2™.

В статистическом анализе результаты измерений количественных переменных исследования представлены медианой и размахом медианы (мин...макс)), категориальных переменных – количеством и процентами от численности группы (n (%)). Сравнения в трех и более группах проводились по критерию Краскела-Уоллиса. Парные сравнения групп проводились с поправкой на множественные сравнения согласно [10]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Расчеты выполнены в статистическом пакете R версия 3.0.1 [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ клиничко-гематологических характеристик позволил определить ведущие синдромы ЖДА и ЛДЖ у обследованных пациентов. При анализе анамнестических данных у пациентов старше 5 лет выявлено, что только 26,3% опрошенных не предъявляли никаких жалоб. Большинство детей (73,7%) предъявляли жалобы на слабость, головную боль, вялость, сонливость днем, головокружение, снижение работоспособности, что характерно как для астенического, так и для анемического синдромов. Клинические проявления анемического синдрома и сопутствующих заболеваний у обследованных пациентов обусловлены степенью тяжести анемии, наличием осложнений, связанных с основным заболеванием. Ведущую сопутствующую патологию составили заболевания органов дыхания и носоглотки: хронический тонзиллит, бронхиальная астма, рецидивирующие обструктивные бронхиты, рецидивирующие отиты, аденоиды, гипертрофия небных миндалин. Заболевания желудочно-кишечного тракта и гепатобилиарной системы

представлены хроническими гастритами, дуоденитами. У двух пациентов с ЖДА диагностирован сахарный диабет, у восьми с ЖДА и одного с ЛДЖ - аутоиммунный тиреоидит. Заболевания почек представлены хроническим пиелонефритом и рецидивирующими инфекциями мочевыводящих путей. При этом 47,4% пациентов с ЖДА имеют два и более сопутствующих заболевания.

Анемический синдром у обследованных детей имел клиническое выражение соответственно концентрации и скорости снижения гемоглобина и проявлялся бледностью кожных покровов и слизистых, повышенной утомляемостью, слабостью, сонливостью, головокружением, тахикардией, одышкой при привычной физической нагрузке. Анемический синдром при ЖДА неспецифичен. Выраженность клинических проявлений анемического синдрома при ЖДА слабо коррелирует с уровнем концентрации гемоглобина. За счет медленного прогрессирования дефицита железа в организме формируется адаптация к этому патологическому состоянию, в результате чего даже при тяжелой степени анемии сохраняется компенсированное состояние пациента. Среди обследованных детей с ЖДА такие явления прогрессирующей анемии, как гемодинамические нарушения и анемическая кома, не наблюдались. У всех обследованных пациентов были выявлены клинические признаки сидеропенического синдрома: *pica chlorotica* (29%), деформация и повышенная ломкость ногтей (41,9%), сухость кожных покровов в области крупных суставов (коленные, локтевые) – 32,3%, койлонихии (35,4%), сухость и ломкость волос (45,2%), ангулярный стоматит (38,7%), мышечная гипотония (19,3%), нарушение иммунной толерантности (45,2%), пастозность (12,9%), нарушение когнитивных функций (32,2%).

Морфологическая характеристика клеток эритроцитарной системы периферической крови у обследованных детей с ЖДА и ЛДЖ соответствовала микроцитарным гипохромным эритроцитам. Изучение основных количественных показателей эритроцитарной системы периферической крови показало при ЖДА снижение концентрации гемоглобина, снижение среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН) и снижение среднего объема эритроцитов (МСV). Гемограмма у всех пациентов с ЛДЖ характеризовалась снижением МСН и МСV. При анализе количественного и качественного состава эритроцитарной системы периферической крови обнаружена гетерогенность клеточной популяции у пациентов с ЖДС в зависимости от возраста. Характер ЖДА у детей старше 3 месяцев соответствовал микроцитарной гипохромной анемии. В группе детей в возрасте до 3-х месяцев характеристики анемии не всегда соответствовали микроцитарной гипохромной, что является классическими признаками ЖДА. У детей с дефицитом железа в возрасте до 3-х месяцев в 60% случаев анемия носила характер нормохромной и нормоцитарной. Такое «несоответствие» классической морфологической картине ЖДА связано с особенностями эритроцитов новорожденных. Количество ретикулоцитов не имело статистически значимых различий по отношению к контролю. Однако у 38,7% детей с дефицитом железа отмечалось снижение степени созревания ретикулоцитов, что может быть связано с нарушением процессов гемоглобинообразования и развитием анемии.

В нашем исследовании оценка феррокинетики проведена всем пациентам с ЖДС и здоровым детям контрольной группы. Анализ метаболизма железа позволил выявить в группах детей с ЖДА и ЛДЖ снижение содержания сывороточного ферритина (СФ), железа и повышение количества трансферрина (ТФ) в сыворотке крови, что подтверждает железодефицитный характер анемии. Однако, средние показатели СФ в группе детей с ЖДА оказались выше аналогичного показателя у детей с ЛДЖ. Это обусловлено наличием в группе ЖДА большего процента пациентов раннего возраста (1-2 месяца), которые имели более высокие значения ферритина в связи с физиологическими возрастными особенностями. Этот факт указывает на необходимость выделения групп детей по возрасту.

Анализ показателей феррокинетики в группе пациентов с ЖДА без учета детей раннего возраста ($n = 56$) показал значительное снижение СЖ (11,5 (2,3...34) ммоль/л) и СФ (5,9 (2,2...19) нг/мл) по сравнению с контролем (таб. 1). Также установлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами пациентов с ЖДА в возрасте 1-17 лет и ЛДЖ по отношению к группе детей с ЖДА в возрасте 0-3 месяца (табл. 1).

Таблица 1. Показатели феррокинетики периферической крови обследованных детей в зависимости от возраста

группы	Показатели феррокинетики периферической крови		
	Железо сыворотки (СЖ) ммоль/л	Трансферрин (ТФ) г/л	Ферритин, (СФ) нг/мл
ЖДА, возраст 0-3 мес., $n = 21$	21,6 (10,0...36,0)	3,6 (2,2...5,1)	30,9 ^{*#} (3,8...144,0)
ЖДА, возраст 1-17 лет, $n = 56$	11,5 [#] (2,3...34,0)	3,4 (2,3...4,8)	5,9 [#] (2,2...19,0)
ЛДЖ, $n = 17$	14,6 [*] (4,5...31)	3,2 (2,1...4,5)	10,3 ^{*#} (2,8...17)
Контроль, $n = 14$	24,0 (15,0...44,1)	2,9 (2,0...3,8)	40,3 (15,2...89,8)

Примечания:

1 - * статистически значимые различия ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе,

2 - # статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами ЖДА в возрасте 1-17 лет и ЛДЖ по отношению к группе ЖДА в возрасте 0-3 месяца

Известно, что в периферической крови ребенка сразу после рождения содержится $(5-10) \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ эритроцитов, а количество гемоглобина колеблется от 180 до 240 г/л. Наличие большого числа эритроцитов, гемоглобина и присутствие множества молодых, незрелых форм эритроцитов в крови у новорожденных свидетельствует об интенсивном внутриутробном эритропоэзе, как компенсаторной реакции на относительную гипоксию плода. Эритроциты детей первых трех месяцев жизни имеют более короткую продолжительность жизни по сравнению с эритроцитами старших детей. Особенности эритропоэза периода новорожденности и грудного возраста диктуют и особые условия для метаболизма железа, так как дети первых месяцев жизни быстро растут, у них очень быстро истощаются запасы железа, полученные во внутриутробном периоде. На сегодняшний день особенности феррокинетики у детей первых месяцев жизни досконально не изучены, нормы основных параметров метаболизма железа (ферритин) носят рекомендательный характер, и использование стандартных тестов обмена железа для определения ЖДС не всегда корректно. Как правило, при анемии у детей в возрасте до 3-х месяцев врач занимает выжидательную позицию и прибегает к назначению препаратов железа при появлении характерных признаков дефицита железа по анализу периферической крови (гипохромия и микроцитоз эритроцитов).

В группах пациентов с ЖДС в возрасте 1-17 лет ферротерапия назначалась сразу же после установления гипохромной анемии и/или дефицита железа по стандартным тестам обмена железа (снижение сывороточного ферритина). Для терапии использовались препараты железа на основе полимальтозного комплекса (в виде таблеток для детей старше 3-х лет и в виде капель для младшей возрастной группы). На фоне терапии препаратами железа как в группе ЖДА, так и в группе ЛДЖ отмечалась положительная динамика показателей эритроидного ростка периферической крови и обмена железа.

Обнаружен статистически значимый прирост концентрации гемоглобина (на 15%), сывороточных ферритина (от 5,9 до 10,3 нг/мл) и железа (от 11,5 до 23,5 ммоль/л) в группе детей с ЖДА в процессе лечения. При ЛДЖ отмечена статистическая значимость повышения только железа сыворотки (от 14,6 до 21,4 ммоль/л). Эти результаты указывают на положительный терапевтический эффект. Лечение ЖДА представляет собой длительный процесс, значимые изменения таких средних показателей как MCV и MCH ожидаются не ранее, чем через 3 месяца. Таким образом, у детей, имеющих дефицит железа в организме, показатели феррокинетики разнятся в зависимости от возраста. На фоне ферротерапии в крови статистически значимо по сравнению с соответствующими показателями до начала лечения возрастает содержание ферритина и железа сыворотки при ЖДА и ЛДЖ, а также концентрации гемоглобина в группе детей с ЖДА в возрасте 1-17 лет.

В результате исследования концентрации ЛФ в сыворотке крови обследованных детей установлено повышение данного показателя в группе детей с дефицитом железа (1202,6 (630...1840) нг/мл) по отношению к контролю (602,4 (520...700) нг/мл), $p = 0,03$ (рисунок 1). При этом отмечалась вариабельность концентрации ЛФ в группах детей в зависимости не от вида дефицита железа, а в зависимости от возраста.

Тот факт, что среднее значение концентрации ЛФ в группах детей 1-17 лет с ЖДА (1175,8 (630...1520) нг/мл) и ЛДЖ (1177,1 (900...1840) нг/мл) практически идентичны, указывает на возможную зависимость данного показателя от содержания железа в организме, но не от концентрации гемоглобина. ЛФ представляет собой белок, близкий по молекулярной массе, трехмерной структуре и железосвязывающим свойствам к ТФ.

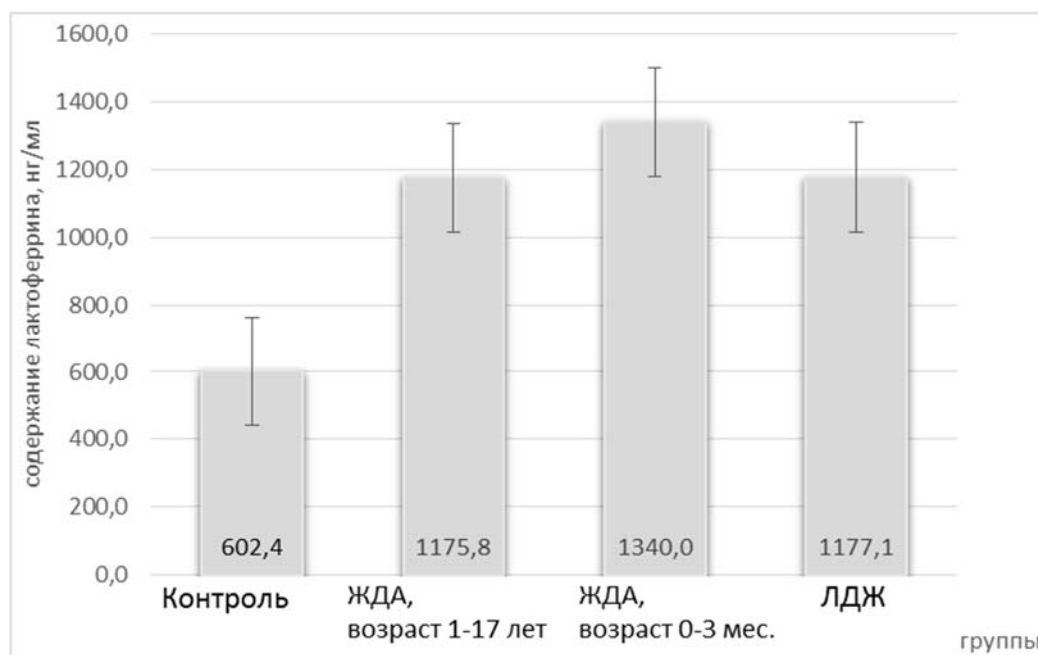


Рисунок 1. Концентрация лактоферрина в плазме крови детей с дефицитом железа и контрольной группы

ЛФ на 59% гомологичен ТФ и является промежуточным звеном для передачи железа в клетки [3]. Поэтому повышение концентрации ЛФ в плазме крови при ЖДС может быть объяснено высокой потребностью в данном биоэлементе и готовностью организма его принимать.

Максимально высокое содержание ЛФ в плазме крови установлено у пациентов в возрасте 0-3 месяца и составило 1340 (1100...1620) нг/мл, что на 15,8% выше по сравнению с группой ЖДА в возрасте 1-17 (1175,8 (630...1520) нг/мл) лет и группой ЛДЖ (1177,1 (900...1840) нг/мл). Повышенное содержание ЛФ в крови новорожденных и детей грудного возраста по сравнению с группой детей старше года, возможно, связано с высокой активностью его железотранспортной функции. В молекуле ЛФ определены 2 активных центра связывания ионов Fe^{3+} , и ЛФ может существовать в виде ненасыщенной и насыщенной форм. В течение первых трех месяцев жизни превалирует высокоактивная насыщенная железотранспортная форма ЛФ, которая рассматривается как один из важных физиологических механизмов адаптационного процесса гемопозитической системы у новорожденных и грудных детей [8].

При анализе концентрации ЛФ в плазме крови детей старше года с различными формами дефицита железа на фоне ферротерапии установлено повышение данного показателя как группе ЖДА (1424,6 (1160...2000) нг/мл), так и в группе ЛДЖ (1266,7 (1180...1220) нг/мл) по сравнению с соответствующими показателями до начала терапии, рисунок 2. При этом у пациентов с ЖДА степень увеличения содержания ЛФ в сыворотке крови имела более высокое значение (на 16,8%) по сравнению с группой ЛДЖ (на 14,9%). Возможно, это связано с более глубоким и длительным дефицитом железа в группе пациентов с ЖДА по сравнению с группой ЛДЖ, где еще сохранен гемоглобиновый фонд железа.

Увеличение концентрации ЛФ в плазме крови детей с ЛДЖ на фоне ферротерапии можно объяснить его железосвязывающей функцией. При дотации железа в организм в виде лекарственных препаратов появляется необходимость в повышении количества ЛФ как промежуточного звена доставки железа в клетки. Также есть описание такой функции ЛФ как участие в межклеточной кооперации фагоцитоза и процессе защиты клеточных мембран от самоперекисидации [9]. Поскольку прием препаратов железа приводит к усилению оксидантного стресса, увеличение содержания ЛФ в плазме крови при ферротерапии может быть связано и с его участием в процессах антиоксидантной защиты организма.

Нами обнаружено уменьшение ОАА плазмы крови детей подростковой группы с ЖДА после лечения ферропрепаратами по сравнению с данными пациентами до лечения (рисунок 3).

Как видно из рисунка 3, наблюдается достоверное ($P < 0,05$) снижение ОАА плазмы крови примерно на 20% у детей с ЖДА после ферротерапии. Это согласуется с литературными данными о том, что прием препаратов железа с целью устранения железодефицитного состояния, приводит к усилению оксидантного стресса. Церулоплазмин, лактоферрин и трансферрин образуют антиоксидантную систему плазмы крови, действие которой основано на окислении ионов Fe^{2+} и связывании Fe^{3+} , а также на взаимодействии этих белков с кислородными радикалами.

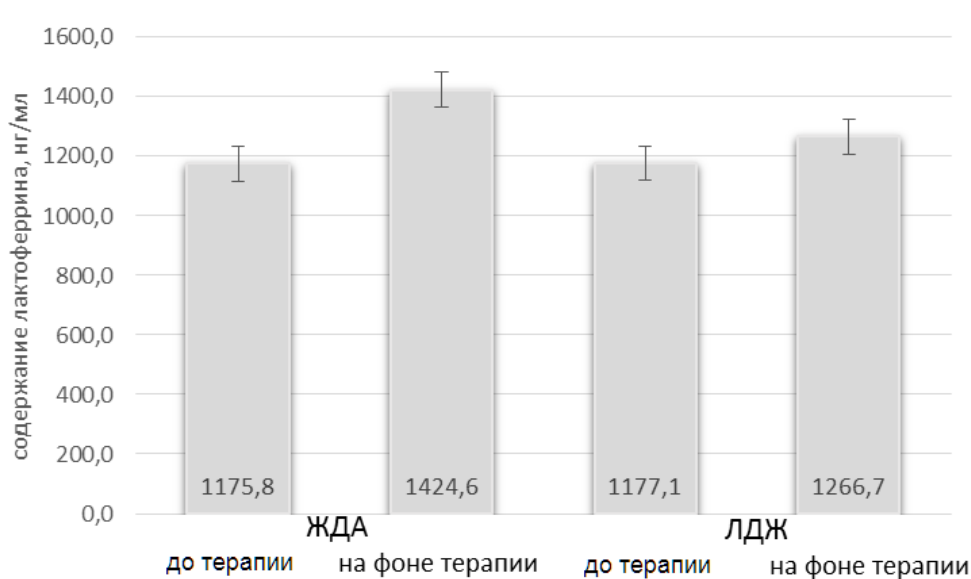


Рисунок 2. Концентрация лактоферрина в плазме крови детей в возрасте старше года с ЖДА и ЛДЖ на фоне ферротерапии

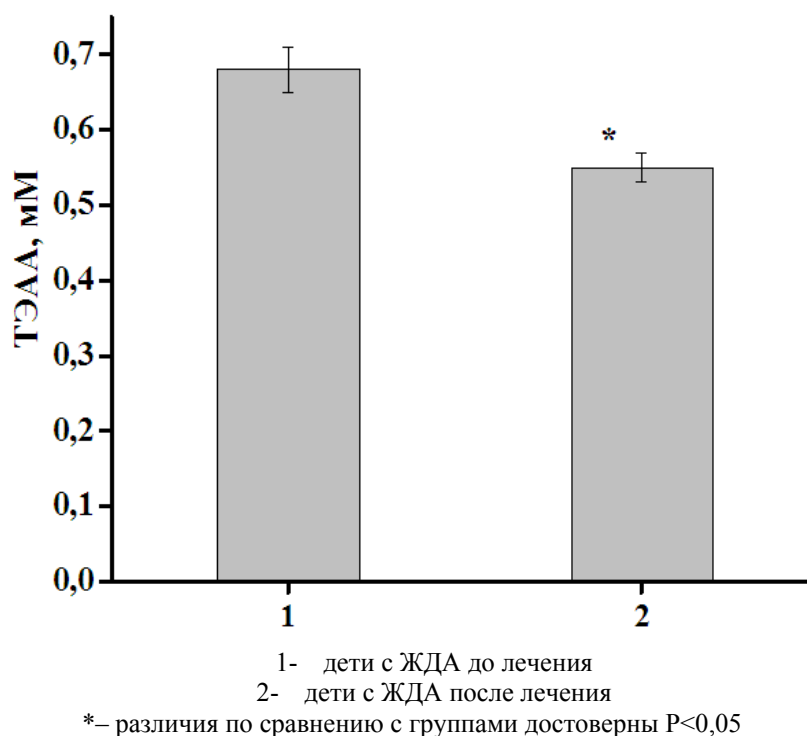


Рисунок 3. Общая антиоксидантная активность плазмы крови детей с ЖДА в возрасте 1-17 лет, выраженная в тролокс-эквивалент антиоксидантной активности (ТЭАА), до и после лечения

При дефиците железа происходит снижение активности гем-содержащего фермента каталазы, а при снижении гемоглобина также страдает обеспечение тканей кислородом. Ранее нами установлено [12], что в эритроцитах детей как подростковой группы, так и новорожденных при ЖДА происходит снижение уровня восстановленного глутатиона по сравнению с соответствующими показателями детей контрольной группы. Было показано, что в эритроцитах детей подростковой группы с железодефицитными состояниями по сравнению с группой практически здоровых детей происходит как снижение активности глутатионтрансферазы, так и уменьшение скорости экспорта конъюгатов глутатиона из клеток, которое зависит от функциональной активности белков-транспортёров ксенобиотиков. Дополнительное снижение антиоксидантной защиты приводит к активному повреждению тканей, контактирующих с ионами железа, а это в первую очередь молодые клетки крови. У новорожденных детей с ЖДА нами обнаружено незначительное увеличение ОАА плазмы крови по сравнению с таковым показателем у детей с ЖДА, которые не принимали ферропрепараты ($0,71 \pm 0,05$ и $0,56 \pm 0,02$ соответственно). Возможно, это связано с повышенным содержанием концентрации лактоферрина в плазме крови детей от 0 до 3 месяцев. Однако мы не выявили корреляционной зависимости между значениями уровня содержания лактоферрина и концентрацией ОАА в плазме крови детей с ЖДА как до лечения, так и после ферротерапии. В настоящее время мы продолжаем изучение этого вопроса на более широком количестве пациентов с ЖДА с учетом их индивидуальных ответов на лечение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у детей, имеющих дефицит железа в организме, показатели феррокинетики разнятся в зависимости от возраста. На фоне ферротерапии в крови статистически значимо по сравнению с соответствующими показателями до начала лечения возрастает содержание ферритина и железа сыворотки при ЖДА и ЛДЖ, а также концентрации гемоглобина в группе ЖДА в возрасте 1-17 лет. Обнаружено снижение ОАА плазмы крови детей подростковой группы с ЖДА после лечения ферропрепаратами по сравнению с данными пациентами до лечения.

У детей с ЖДС возрастает концентрация ЛФ в плазме крови, которая имеет вариабельные значения в зависимости от возраста. Наибольшие показатели содержания ЛФ характерны для пациентов в возрасте до трех месяцев, что связано с физиологическими механизмами адаптационного процесса гемопоэтической системы у новорожденных и грудных детей.

Полученные результаты будут использованы в дальнейшем для определения обеспеченности организма железом и прогнозировании ответа на специфическую терапию ферросодержащими препаратами.

Список литературы / References:

1. Tandara L. et al. Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochemia Medica*, 2012, vol. 22, no. 3, pp. 311-328.
2. Zakharova I.N. et al. Correction of iron deficiency: background and current aspects. *Voprosy prakticheskoy pediatrii*, 2014, vol. 9, no. 4, pp. 2-7.
3. WHO. Programme and project: WHO. Available at: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/index.html>. Accessed August 10th 2011.
4. Kassebaum N.J. et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*, 2014, vol. 123, pp. 615-624.
5. Benoist B. et al. *Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia*. Geneva: WHO Press, 2008, 41 p.
6. Ward P.P., Connely O.M. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals*, 2004, vol. 17, no. 3, pp. 203-208.
7. Aliyeva A.M., Namazova-Baranova L.S., Kazyukova T.V., Studentkin V.M. The iron metabolism in children is normal also at infectious diseases. *Detskiye infekcii*, 2017, vol. 1, pp. 21-27.
8. Djukareva-Bezdenzhnykh S. Maintenance the basic haemopoetic components of infants at feeding by breast milk. *Perinatalogiya i pediatria*, 2008, vol. 3, pp. 108-111.
9. Gao X. et al. Nonparametric Multiple Comparison Procedures for Unbalanced One-Way Factorial Designs. *JSPI*, 2008, vol. 138, no. 8, pp. 2574-2591.
10. R Core Team *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013. Available at: <http://www.R-project.org>.
11. Kuznetsov I.A., Potievskaya V.I., Kachanov I.V., Kuraleva O.O. Lactoferrin's role in biological circles of the person. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2017, vol. 3, pp. 69.
12. Zubritskaya G.P., Klimkovich N.N., Kutko A.G., Venskaya E.I., Skorobogatova A.S., Lukyanenko L.M., Kozarezova T.I., Slobozhanina E.I. Changes of the glutathione range of the antioxidant system in erythrocytes of children with iron deficiency anemia. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*, 2019, vol. 8, no. 2, pp. 217-226.

CHANGES OF INDICES OF FERROKINETICS, TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY AND LACTOFERRIN CONCENTRATION IN THE PLASMA OF CHILDREN WITH IRON DEFICIENCY IN PROGRESS OF TREATMENT

Slobozhanina E.I.¹, Zubritskaya G.P.¹, Klimkovich N.N.², Venskaya E.I.¹, Kutko A.G.¹, Skarabhatava A.S.¹, Lukyanenko L.M.¹, Kozarezova T.I.²

¹ Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus,
Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, RB; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by

² Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education
Brovki str., 3, build. 3, Minsk, 220013, RB; e-mail: det.hematology@mail.ru

Abstract. The investigation of ferrokinetics, total antioxidant activity, and plasma lactoferrin concentration in the plasma of children 0-17 years old with iron deficiency (iron-deficiency anemia and latent iron deficiency) before and after treatment was made. It was shown that after treatment with ferro drug group of adolescent patients, ferritin (from 5.9 to 10.3 ng/ml) and iron (from 11.5 to 23.5 mmol/l) concentration in blood serum increased, but total plasma antioxidant activity decreased in contrast with data before treatment (~20%, $P < 0.05$). While iron deficiency lactoferrin concentration in plasma raised with a maximum in a group of children 0-3-month-old. During ferrotherapy lactoferrin concentration also increased in comparison with the results before treatment. Obtained results showed the necessity of considering the level total antioxidant activity of plasma children with iron deficiency during treatment with ferro drugs.

Key words: iron deficiency, ferrokinetics, total antioxidant activity, lactoferrin, children.

ДЕЙСТВИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СВОБОДНЫЕ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ТРИПСИН И КОЛЛАГЕНАЗУ

Панкова С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: sazykina.93@mail.ru

Поступила в редакцию: 25.07.2019

Аннотация. Исследованы механизмы воздействия УФ-света в диапазоне доз 151-6040 Дж/м² на трипсин и коллагеназу, свободные и иммобилизованные на матрице кислоторастворимых средномолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов. Ферментативная активность молекул свободных протеаз под воздействием УФ-света подвержена изменению в большей степени, чем в иммобилизованном состоянии. Иммобилизация приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободными ферментами, возможно, за счет образования комплекса фермент-носитель, белки становятся более устойчивыми к такому физическому агенту как УФ-свет. Приведенные в работе данные свидетельствуют о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующими причинами: молекулы трипсина и коллагеназы при взаимодействии с матрицей хитозана образуют фоторезистентные комплексы; молекулы хитозана экранируют активные фотопродукты свободнорадикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа аминокислот указанных ферментов при воздействии УФ-облучения.

Ключевые слова: УФ-излучение, трипсин, коллагеназа, иммобилизация, хитозан.

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме изучения фотодеструктивных реакций, протекающих в биологических системах под действием света ультрафиолетовой (УФ) области спектра. Это связано, прежде всего, с важной ролью фото процессов в реализации фототоксических и фотоканцерогенных эффектов в коже человека при действии солнечного излучения и поиском эффективных эндогенных фотозащитных систем, уменьшающих повреждающее действие ультрафиолетового излучения на биологические системы. Основной задачей исследователей остается изучение и анализ механизмов трансформации энергии УФ-излучения, поглощенной живыми системами различных уровней организации. Это, в первую очередь, связано с тем, что УФ-свет выступает в качестве тонкого регуляторного агента, позволяющего исследовать биофизические основы взаимосвязей сетей, обеспечивающих поддержание различных типов гомеостатических процессов организма [1, 2]. Немаловажной задачей является изучение структуры и физико-химических свойств ферментов, иммобилизованных на полимерных носителях. Сорбентом природного происхождения является хитозан, который представляет собой продукт деацетилирования хитина. Данный полимер обладает биосовместимостью, низкой токсичностью и неиммуногенностью, что обуславливает широкое применение этого катионного биополимера в медицине и фармакологии – от покрытий на раны и ожоги до систем направленной доставки лекарств в микро частицах [3]. Особую значимость приобретают работы по выявлению типов взаимодействий ферментов с различными соединениями на молекулярном уровне, способствующие пониманию механизмов действия полиферментных систем и разработке путей регуляции активности биокатализаторов. Наиболее широко используемыми в медицинской практике являются протеолитические ферменты. Характерной чертой протеаз является избирательное расщепление денатурированных белков некротических тканей при отсутствии воздействия на живые участки, т.е. при помощи ферментативного лизиса из организма в основном удаляются белки омертвевших тканей.

Коллагеназа (КФ 3.4.24.3) – фермент, способный гидролизовать нативный коллаген при физиологических значениях pH и температуры. В настоящее время известно 7 видов коллагеназы, синтезируемой возбудителем газовой гангрены *Clostridium histolyticum*. Все коллагеназы *C. histolyticum* представляют собой одноцепочечные белки. Молярные массы ферментов варьируют от 68 до 130 кДа. Они используются в диагностических и лабораторных целях: для удаления некротических тканей из ран на микроскопическом уровне, лечения заболеваний глаз в офтальмологии, после операционных спаек, морщин, ускорения рассасывания швов из кетгута и рубцовых образований [4-6].

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью. Трипсин синтезируется в поджелудочной железе в виде неактивного предшественника (профермента) трипсиногена. Молекулярная масса трипсина составляет 25 кДа. Трипсин используют для изготовления лекарств. Препараты трипсина обладают противовоспалительным и противоотечным действием (при внутривенном и внутримышечном введении); способны избирательно расщеплять ткани, подвергшиеся некрозу. В медицине трипсин применяют для лечения ран, ожогов, тромбозов, часто в сочетании с другими ферментами и с антибиотиками [7].

Известен способ лечения ожоговых ран путем воздействия светом от источника ультрафиолетового излучения, прошедшим предварительно через полимерную пленку, расположенную на расстоянии 15-20 см от раневой поверхности. Данный метод обладает бактерицидным эффектом, способствует стимуляции репаративных процессов и ускорению эпителизации, что приводит к уменьшению сроков госпитализации [2, 4].

Облучение ожоговых ран ультрафиолетовым светом коротковолнового спектра является эффективным способом их лечения, благодаря выраженному антибактериальному эффекту ультрафиолетового излучения, а также его поверхностному действию, в итоге было зафиксировано отсутствие микроабсцессов и клеточной инфильтрации [2].

Таким образом, комплексное использование действия УФ-излучения, трипсина и/или коллагеназы, возможно, будет способствовать более быстрому восстановлению раны или ожога и сокращению сроков заживления кожных покровов. В связи с этим целью нашей работы стало изучение действия УФ-излучения на свободные и иммобилизованные протеазы.

В качестве объекта исследования был выбран трипсин быка фирмы “MP biomedical”, коллагеназа из *Clostridium histolyticum* фирмы “Sigma-Aldrich”, субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “Sigma-Aldrich”, носителями для иммобилизации – два вида хитозана, синтезированных ЗАО “Биопрогресс”: хитозан пищевой кислоторастворимый среднемoleкулярный ($M_r = 200$ кДа, степень деацетилирования (СД) 82%) и хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа, СД = 94,85%).

Иммобилизацию ферментов на хитозане осуществляли адсорбционным методом. 1 г носителя помещали на 1 ч при комнатной температуре в 10 мл фосфатного буфера (рН 5,8). Далее к суспензии хитозана добавляли 5 мл раствора трипсина и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 2 ч при температуре 25 °С. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1500 g, осадок промывали буфером (рН 5,8) до отсутствия белка в промывных водах. Контроль за содержанием белка осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при 280 нм.

Определение количества белка в препаратах и активности протеаз проводили модифицированным методом Лоури [8,9].

УФ-облучение растворов свободных и иммобилизованных трипсина и коллагеназы проводили при их непрерывном перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете (20 ± 1 °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 мин. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

При УФ-облучении свободного трипсина в дозах 151 и 453 Дж/м² мы наблюдали тенденцию к увеличению активности фермента, начиная с дозы облучения 1510 Дж/м², происходит незначительное снижение его каталитической способности, которое становится статистически значимым при дозах 3020, 4530, 6040 Дж/м². При указанных выше дозах облучения активность трипсина снижается на 28,3, 31,7, 48,6% соответственно.

При УФ-облучении трипсина, иммобилизованного на матрице пищевого кислоторастворимого среднемoleкулярного хитозана, в дозе 453 Дж/м² выявляется тенденция к увеличению активности препарата. При дозах 4530 и 6040 Дж/м² зарегистрировано снижение каталитической способности энзима, которое составляет соответственно 6,3 и 10,7% (рис. 1).

После УФ-облучения трипсина, иммобилизованного на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана, в диапазоне доз 1510-4530 Дж/м² фермент сохраняет свою активность на первоначальном уровне. Снижение каталитической способности энзима происходит только после воздействия дозой 6040 Дж/м² (рис. 1).

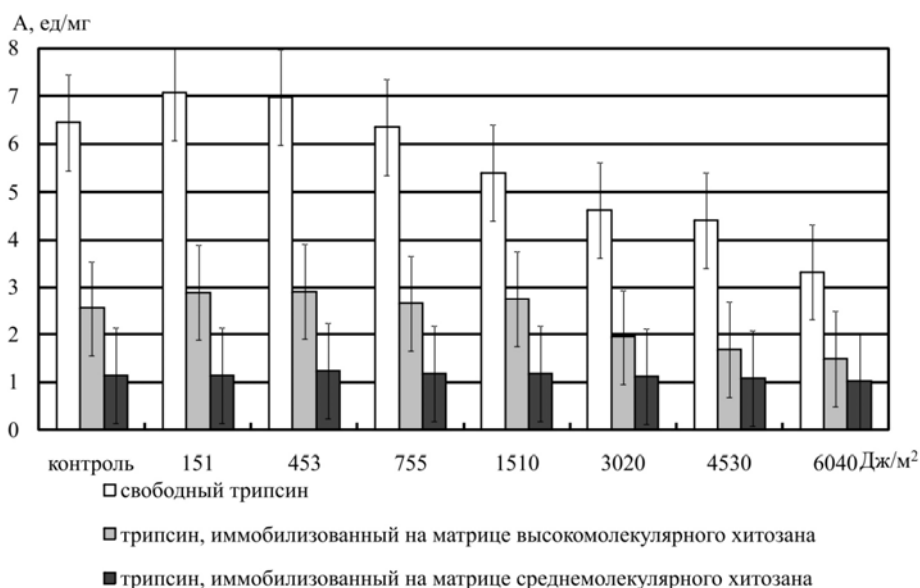


Рисунок 1. Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (ед/мг белка) трипсина, свободного и иммобилизованного на матрицах высокомолекулярного и среднемoleкулярного хитозанов

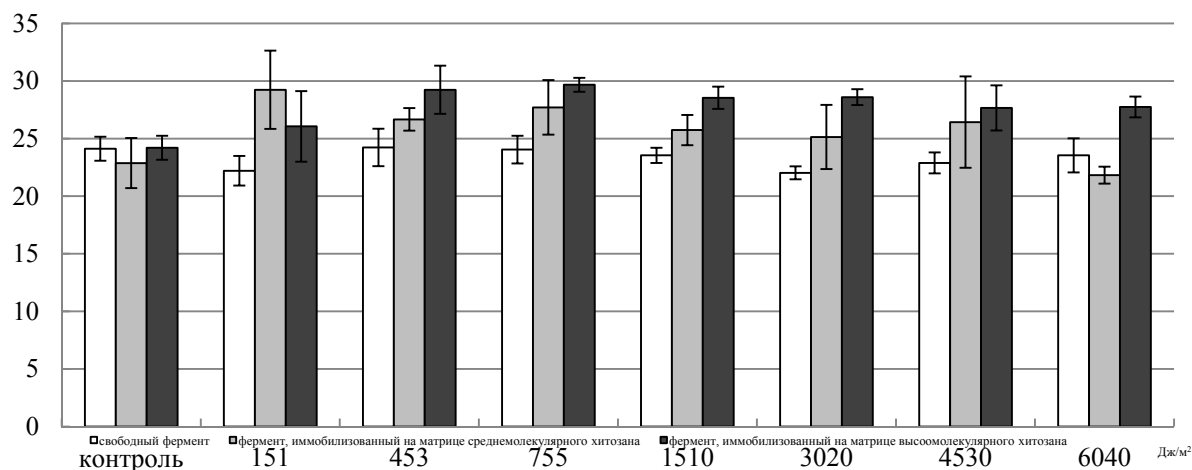


Рисунок 2. Влияние УФ-излучения на удельную каталитическую активность (ед/мг белка) коллагеназы, свободной и иммобилизованной на матрицах высокомолекулярного и среднемoleкулярного хитозанов

При УФ-облучении свободной коллагеназы в дозах 151-1510 Дж/м² изменение удельной каталитической активности фермента не зарегистрировано, энзим сохранял свою активность на относительно постоянном (первоначальном) уровне. Снижение каталитической способности свободного препарата на 8,7% происходило только после воздействия дозой 3020 Дж/м²

После иммобилизации коллагеназы на матрице пищевого кислоторастворимого среднемoleкулярного хитозана при УФ-облучении в дозе 151 Дж/м² наблюдалось увеличение активности фермента на 27,8%, возможно, это связано с молекулярными перестройками в третичной структуре молекулы. При использовании доз 1510-6040 Дж/м² активность коллагеназы возвращалась на первоначальный уровень.

После иммобилизации коллагеназы на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана при УФ-облучении в дозах 453 и 755 Дж/м² зарегистрировано увеличение каталитической активности фермента на 20,9 % и 22,6 % соответственно. При дальнейшем УФ-облучении с повышением дозы изменение активности коллагеназы не выявлено (рис. 2).

Таким образом, ферментативная активность молекул свободных протеаз под воздействием УФ-света подвержена изменению в большей степени, чем в иммобилизованном состоянии. Иммобилизация приводит к повышению стабильности гетерогенных биокатализаторов по отношению к УФ-облучению по сравнению со свободными энзимами, возможно, за счет образования комплекса фермент-носитель, белки становятся более устойчивыми к действию УФ-света.

Приведенные выше данные свидетельствуют о фотопротекторном эффекте матрицы хитозана, который может быть обусловлен следующими причинами: молекулы трипсина и коллагеназы при взаимодействии с матрицей хитозана образуют фоторезистентные комплексы; молекулы хитозана экранируют активные фотопродукты свободнорадикальной природы, предотвращая фотоокисление определенного числа аминокислот изученных ферментов при воздействии УФ-облучения.

Список литературы / References:

1. Пиняскина Е.В. Реактивирующее и протекторное действие красного света на дрожжевые клетки, инактивированные УФ-излучением. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2011, т. 13, № 1 (5), с. 1137-1139. [Pinyaskina E.V. The reactive and protective effect of red light on yeast cells inactivated by UV radiation. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2011, vol. 13, no. 1 (5), pp. 1137-1139. (In Russ.)]
2. Реброва Г.А., Василевский В.К., Ребров Л.Б., Осипова Л.А., Быков В.А. Биохимическое и фотометрическое исследование модификации структуры коллагена при УФ-облучении. *Биомедицинская химия*, 2007, т. 53, № 4, с. 442-453. [Rebrova G.A., Vasilevskij V.K., Rebrov L.B., Osipova L.A., Bykov V.A. Biochemical and photometric studies of the modification of collagen structure under UV irradiation. *Biomedicinskaya himiya*, 2007, vol. 53, no. 4, pp. 442-453. (In Russ.)]
3. Костина Н.Ю., Горшкова М.Ю., Изумрудов В.А. Водорастворимые полиплексы модифицированного хитозана. *Высокомолекулярные соединения. Серия А*, 2011, т. 53, № 10, с. 1767-1775. [Kostina N.Yu., Gorshkova M.Yu., Izumrudov V.A. Water-soluble polyplexes of modified chitosan. *High molecular weight compounds. Series A*, 2011, vol. 53, no. 10, pp. 1767-1775. (In Russ.)]
4. Jung W., Winter H. Considerations for the Use of *Clostridial Collagenase* in Clinical Practice. *Journal of Clinical Drug Investigation*, 1998, vol. 15, no. 3. DOI: 10.2165/00044011-199815030-00009.

5. Peacock Jr. E.E., Collagenolysis M.D. The Other Side of the Equation World. *World Journal of Surgery*, 1980, vol. 4. DOI: 10.1007/BF02393385.
6. Watanabe K. Collagenolytic proteases from bacteria. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, vol. 63. DOI: 10.1007/s00253-003-1442-0.
7. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М. Исследование процессов УФ-модификации свободного и иммобилизованного трипсина. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 1, с. 66-70. DOI: 10.7868/S0869803117010064. [Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Sazykina S.M. Investigation of the processes of UV modification of free and immobilized trypsin. *Radiation biology. Radioecology*, 2017, vol. 57, no. 1, pp. 66-70. (In Russ.)]
8. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана. *Фундаментальные исследования*, 2013, № 11-3, с. 484-487. [Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Development of a method for producing a heterogeneous biocatalyst based on trypsin immobilized on a chitosan matrix. *Basic Research*, 2013, no. 11-3, pp. 484-487. (In Russ.)]
9. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности. *Вестн. ВГУ. Серия: "Химия. Биология. Фармация"*, 2013, № 2, с. 116-119. [Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Belenova A.S. Selection of methods for the quantitative determination of trypsin immobilized on a chitosan matrix and its catalytic activity. *Vestn. VSU. Series: "Chemistry. Biology. Pharmacy"*, 2013, no. 2, pp. 116-119. (In Russ.)]

ACTION OF UV RADIATION ON FREE AND IMMOBILIZED TRIPSINE AND COLLAGENASE

Pankova S.M., Holyavka M.G., Artyukhov V.G.

Voronezh State University

University Square 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: sazykina.93@mail.ru

Abstract. The mechanisms of exposure to UV light in the dose range of 151-6040 J/m² on trypsin and collagenase free and immobilized on a matrix of acid-soluble medium molecular weight (200 kDa) and high molecular weight (350 kDa) chitosans were studied. The enzymatic activity of molecules of free proteases under the influence of UV light is subject to change to a greater extent than in the immobilized state. Immobilization leads to an increase in the stability of heterogeneous biocatalysts with respect to UV irradiation compared to free enzymes, possibly due to the formation of an enzyme – carrier complex, proteins become more resistant to such a physical agent as UV light. The data presented in this paper testify to the photoprotective effect of the chitosan matrix, which may be due to the following reasons: trypsin and collagenase molecules interact with the chitosan matrix to form photoresistant complexes; Chitosan molecules screen active photoproducts of a free radical nature, preventing the photo-oxidation of a certain number of amino acids of these enzymes when exposed to UV light.

Key words: UV radiation, trypsin, collagenase, immobilization, chitosan.

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕТИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ В ПРИСУТСТВИИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Хлудеев И.И.^{1,2}, Самцов М.П.², Ляшенко Л.С.³, Луговский А.А.²

¹ Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
ул. П. Бровки, 6, г. Минск, 220013, Беларусь; e-mail: ivan2khl@mail.ru

² Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко

Белорусского государственного университета
ул. Курчатова, 7, г. Минск 220045, Беларусь

³ Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, г. Минск, Беларусь

Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. В работе исследовано влияние химической структуры группы катионных полиметиновых фотосенсибилизаторов, синтезированных в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. Севченко БГУ, на их распределение среди белков сыворотки крови. С использованием метода гель-хроматографии установлено, что исходный индотрикарбоцианиновый краситель ПК154 связывается преимущественно с молекулами сывороточного альбумина. Химическая модификация, состоящая в замещении двух карбоксильных групп молекулами полиэтиленгликоля (300 кДа), приводит к увеличению сродства красителя ПК220 к липопротеинам, а использование незамещенной полиметиновой цепи блокирует связывание красителя ПК222 с белками сыворотки крови. Спектральные измерения показали, что водных растворах красителей ПК154 и ПК220 наблюдается сильный (20-25 нм) батохромный сдвиг максимумов спектров поглощения при добавлении сыворотки крови. В то же время краситель ПК222 не реагирует на присутствие сыворотки в растворе. Анализ отдельных белковых фракций, окрашенных красителями, показал существенное влияние типа сывороточного белка в составе комплекса с полиметиновыми красителями на спектральные характеристики последних. Установлено появление коротковолнового пика в спектрах поглощения комплексов краситель-альбумин. Обсуждаются возможные биофизические механизмы процессов, приводящих к наблюдаемым особенностям поведения полиметиновых красителей в присутствии белков сыворотки крови, а также возможности их использования в медико-биологических целях.

Ключевые слова: полиметиновые фотосенсибилизаторы, белки сыворотки крови.

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) активно используется при лечении ряда онкологических заболеваний. Он обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами лечения злокачественных новообразований – малой инвазивностью и избирательностью воздействия на ткани-мишени. В значительной степени это обусловлено селективностью накоплению фотосенсибилизаторов (ФС) в опухолях вследствие особенностей их строения и функционирования (закисление интерстициальной жидкости, хаотичная васкулярная система, повышенное число рецепторов к липопротеинам низкой плотности). В стандартном протоколе ФДТ препарат вводят в организм внутривенно, поэтому локализация и контрастность накопления ФС зависит от процессов транспорта в кровеносной системе. Для многих ФС, которые используются в клинической практике, показано, что в кровотоке они перемещаются в составе комплексов с белками сыворотки крови (БСК), преимущественно с липопротеинами высокой (ЛВП) и низкой плотности (ЛНП) и сывороточным альбумином (САЧ) [1]. Связывание ФС с белками сыворотки крови, которое играет важную роль в механизмах транспорта ФС в организме, может заметно сказываться на спектральных и фотофизических характеристиках ФС. Поскольку для оценки содержания ФС в крови и опухолях широко используются оптические методы, необходимо знать и учитывать возможное влияние взаимодействия молекул ФС с сывороточными белками не только на их фармакокинетическое поведение в крови, но также и на их фотофизические характеристики. Вследствие этого анализ различных аспектов взаимодействия ФС с белками сыворотки крови является важным для оптимизации протоколов ФДТ.

Полиметиновые (трикарбоиндоцианиновые) красители (ПК) считаются перспективными для использования в ФДТ, поскольку они обладают интенсивной полосой поглощения (720-750 нм) в так называемой «полосе прозрачности тканей». Однако большинство ПК являются гидрофобными соединениями, которые очень слабо либо вообще нерастворимы в воде. Вследствие этого в водной среде наблюдается агрегация ПК, которая может приводить к существенным изменениям их спектральных и фотофизических характеристик. Образование комплексов ПК с белками сыворотки крови также может влиять на спектрально-флуоресцентные характеристики, во-первых, за счет разрушения агрегатов и перехода ПК в мономерное состояние, и, во-вторых, за счет изменения полярности микроокружения молекул ПК в составе комплексов краситель-белок.

Таблица 1. Влияние присутствия белков сыворотки крови на спектры поглощения полиметиновых красителей в водных растворах

Краситель	Максимум спектра поглощения, нм				
	ФСБ pH 7,4	Сыворотка 2%	ЛНП	САЧ	
ПК154	704	730	752	731	636
ПК220	708	728	737	725	626
ПК222	744	745	—		—

Целью исследования являлось изучение распределения ПК среди белков сыворотки крови и оценка влияния комплексообразования ПК с различными транспортными белками на спектральные и фотохимические характеристики красителей.

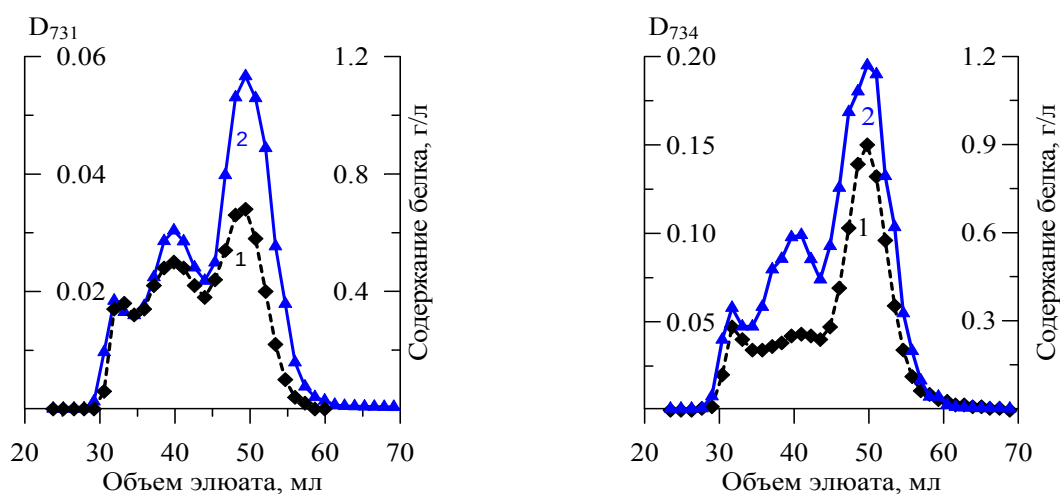
В работе использовали синтезированные в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. Севченко [2] красители: ПК154 и его производное ПК220, полученное путем замещения двух карбоксильных групп молекулами полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400 кДа. Исходные растворы ПК с концентрацией 5×10^{-4} моль/л готовили в этаноле (ПК154) и в дистиллированной воде (ПК220). Спектры поглощения и люминесценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра СОЛАР СМ-2203. Оценку связывания ПК с компонентами сыворотки крови человека проводили методом эксклюзионной гель-хроматографии на колонках Sigma ($1,5 \times 50$ см) с гелем Sephadex G-200, уравновешенным фосфатно-солевым буфером Дюльбекко pH 7,4 (ФСБ), который использовался также и в качестве элюента.

Исследуемые красители по показателю водорастворимости можно расположить в ряду $ПК154 < ПК220 \leq ПК222$. Анализ спектров поглощения, результаты которого приведены в таблице 1, показывает, что имеются сильные различия в поведении ПК в водной среде.

Для ПК154 и ПК220 добавление сыворотки крови в раствор приводит к сильному батохромному сдвигу максимумов спектров поглощения. В то же время ПК222 никак не реагирует на присутствие в растворе сыворотки. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что молекулы ПК154 и ПК220 в фосфатном буфере находятся в агрегированном состоянии. Добавление сыворотки приводит к дезагрегации красителей, по крайней мере, частичной, вследствие образования комплексов с сывороточными белками. Для ПК222 подобный эффект не наблюдается, что говорит о том, что молекулы ПК222 в водных растворах изначально присутствуют в мономерной форме.

При разделении образцов сыворотки крови человека, окрашенной ПК154 и ПК220, с помощью метода эксклюзионной гель-хроматографии было установлено, что исследуемые соединения выходят из колонки вместе с фракциями САЧ, ЛВП и ЛНП (рис. 1).

Это свидетельствует о том, что данные ПК образуют комплексы с БСК. Следует отметить, что длительность предварительной инкубации образцов окрашенной ПК сыворотки, которая необходима для достижения равновесного распределения каждого из красителей среди белков сыворотки, сильно различалась. Так, при комнатной температуре после введения в образец сыворотки водного раствора ПК154 требовалось 2 часа прединкубации, а для ПК220 – 24 часа для достижения равновесия. Это может быть связано с особенностями структуры молекул – скорость диффузии у компактных молекул ПК154 вероятно существенно выше в сравнении с громоздкими молекулами ПК220. Это косвенно подтверждается тем фактом, что при повышении температуры инкубации до 37°C время достижения равновесного распределения для ПК220 сокращалось до 2 часов.

**Рисунок 1.** Связывание красителей ПК220 (левая панель) и ПК154 (правая панель) с белками сыворотки крови человека: 1 – оптическая плотность фракций в максимуме поглощения ПК, 2 – концентрация белка во фракциях

Для ПК222 краситель выходил из колонки одним пиком, причем объем исключения для красителя был значительно больше, чем для белковых фракций. Это позволяет сделать вывод о том, что ПК222 практически не взаимодействует с белками сыворотки крови, и находится в водной фазе в мономерном состоянии.

Для гидрофобного ПК154 относительное количество пигмента, обнаруженного во фракциях САЧ, было почти в 2 раза больше в сравнении с количеством пигмента во всех липопротеиновых фракциях, что свидетельствует о преимущественном связывании молекул ПК154 с молекулами САЧ. В то время как для водорастворимого ПК220 характерно относительно высокое сродство к липопротеинам, поскольку более 50% суммарного количества красителя обнаруживается во фракциях ЛВП+ЛНП. При анализе спектров поглощения ПК было показано, что как ПК154, так и ПК220 при попадании в водную среду (фосфатный буфер, pH 7,4) подвержены самоагрегации, поскольку наблюдался гипсохромный сдвиг полосы поглощения данных красителей по сравнению со спектрами поглощения в неорганических растворителях [3]. Титрование образцов водных растворов ПК аликвотами сыворотки крови приводило к смещению максимумов спектров поглощения в красную область, что характерно для процессов дезагрегации некоторых неполярных ФС, например, фталоцианинов [4]. При добавлении даже небольших количеств сыворотки крови человека наблюдается батохромный сдвиг полос. Для ПК154 максимум спектра поглощения смещается от 704 нм (ФСБ) до 732 нм (1% сыворотки). Схожий эффект наблюдали и для ПК220, однако требовались более высокие концентрации сыворотки. Так, максимальный длинноволновый сдвиг максимума спектра поглощения от 709 нм (ФСБ) до 729 нм имел место при концентрации сыворотки $\geq 2\%$.

Анализ спектров поглощения ПК в различных белковых фракциях, полученных при гель-хроматографическом разделении образцов окрашенной сыворотки крови человека, обнаружил существенные различия в спектральных характеристиках. Как видно из представленных на рисунке 2 результатов полосы поглощения ПК в комплексах с липопротеинами сдвинуты в длинноволновую область в сравнении со спектрами поглощения комплексов ПК-САЧ.

Для ПК 154 разница в положении максимумов поглощения во фракции ЛНП и САЧ превышала 20 нм, в то время как максимумы поглощения комплексов ПК220-ЛНП и ПК220-САЧ различались всего на 12 нм. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что молекулы ПК в составе комплексов с ЛНП находятся в более неполярном микроокружении в сравнении с комплексами с САЧ. Можно предположить, что молекулы ПК могут погружаться в липидный слой липопротеиновой частицы, в то время как связывание с молекулами САЧ происходит на сайтах с различным сродством к молекулам ПК. Можно также предположить, что глубина встраивания молекул ПК154 больше, чем для молекул ПК220, у которых длинные цепочки полиэтиленгликоля могут играть роль «якорей», ограничивающих глубину погружения в липидную оболочку ЛНП. Следует отметить, что при экстракции ПК из состава комплексов с белками сыворотки крови также наблюдаются существенные различия в поведении красителей. Так для ПК 154 процесс распределения в двухфазной системе бутанол-сыворотка приводил к переходу более 85% красителя в органический растворитель, в то время как почти весь ПК220 оставался в водной фазе. Данный факт не связан с различиями в водорастворимости ПК, поскольку при смешивании растворов красителей в воде или фосфатном буфере с бутанолом около 97% как ПК154, так и ПК220 переходили в органический растворитель. Можно предположить, что в процессе образования комплексов ПК220 с белками сыворотки происходит ковалентное связывания красителя с белками, которое блокирует процесс перераспределения ПК220 с белков в органическую фазу.

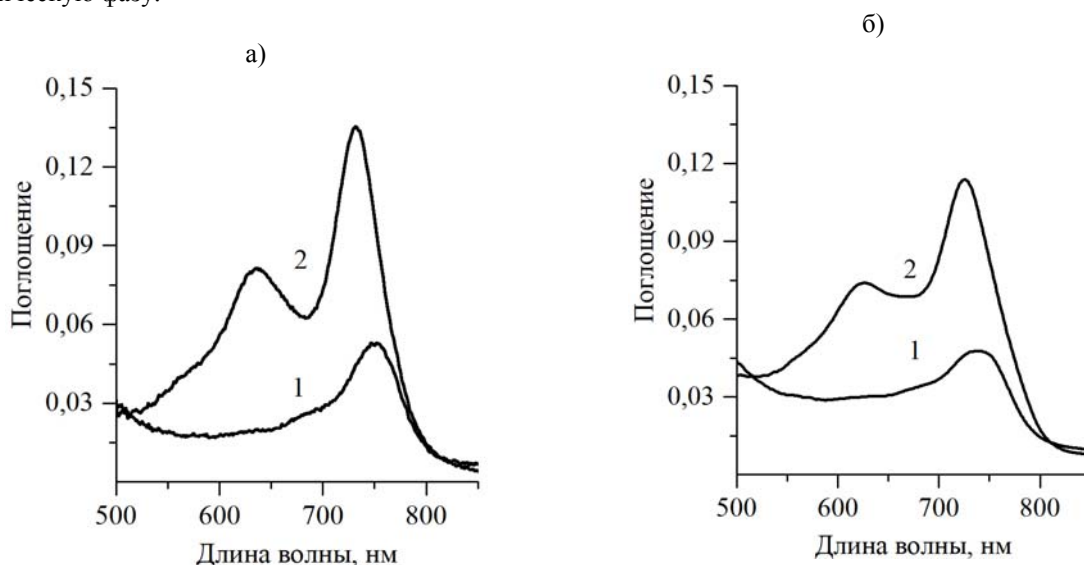


Рисунок 2. Спектры поглощения ПК154 (а) и ПК220 (б) в составе комплексов с ЛНП (1) и САЧ (2)

Кроме того, в спектрах поглощения альбуминовых фракций дополнительно появляются полосы поглощения с максимумами при 636 нм для ПК154 и 626 нм для ПК220. Появление этих полос связано не с процессами агрегации-деагрегации красителей, а с образованием в образцах неких структур, имеющих отличные от ПК спектры поглощения. Вероятно, это происходит в процессе частичной деградации молекул ПК. Это подтверждается результатами проведенного ранее масс-спектрометрического анализа растворов ПК, в ходе которого были обнаружены соединения, поглощающие в области 630 нм и имеющие молекулярную массу приблизительно в два раза меньшую, чем молекулярная масса исходного красителя.

Таким образом, образование комплексов ПК с транспортными белками сыворотки крови способствует переходу красителей из агрегированного в мономерное состояние. При этом наблюдается bathochromный сдвиг спектров поглощения ПК в составе комплексов, величина которого зависит как от химической структуры красителя, так и от природы белка-носителя. Молекулы ПК, связанные с САЧ, в большей степени подвержены деградации в сравнении с молекулами красителя в составе комплексов ПК-ЛНП. Наблюдаемое более высокое сродство ПК220 к липопroteинам может положительно влиять на скорость накопления этого соединения в опухолевых клетках, имеющих, как известно, повышенное количество экспонированных на поверхности рецепторов к ЛНП. В то же время активное связывание ПК154 с альбумином может способствовать накоплению этого красителя в строме солидных опухолей. Инертный водорастворимый ПК222 может представлять интерес для использования в ангиографических исследованиях сосудистого кровотока.

Проведенные исследования показывают, что образование комплексов ПК с белками сыворотки крови существенно влияет на спектральные характеристики полиметиновых фотосенсибилизаторов. Природа белка-носителя сказывается как на спектрах поглощения ПК в составе комплексов, так и на интенсивности протекания процессов деградации ПК. Установленные особенности требуют более тщательного подхода к разработке методик измерения содержания ПК в плазме крови с использованием оптических методов.

Список литературы / References:

1. Hasan T. et al. *Photosensitizer Transport and Distribution. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.* Hamilton: BC Decker, 2003.
2. Lugovski A. et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2016, vol. 316, pp. 31-36.
3. Белько Н.В. и др. Влияние комплексообразования с белками плазмы крови на спектральные характеристики трикарбоцианиновых красителей. *Весті БДПУ. Серія 3. Фізика. Математика. Інформатика. Біологія. Географія*, 2018, № 1. с. 14-20. [Belko N. et al. Influence of complex formation with blood plasma proteins on the spectral characteristics of tricarbocyanine dyes. *BSPU Bulletin. Series 3. Physics. Mathematics. Informatics. Biology. Geography*, 2018, no. 1, pp.14-20 (In Ukr.)]
4. Harvey, P.D. Recent advances in free and metalated multiporphyrin assemblies and arrays; a photophysical behavior and energy transfer perspective. *The porphyrin handbook. Elsevier Science, USA*, 2003, vol. 18, pp. 63-250.

PHOTOPHYSICAL PROPERTY OF POLYMETHINE PHOTSENSITIZERS BEHAVIOR IN AN AQUEOUS SOLUTION IN THE PRESENCE OF SERUM PROTEINS

Khludkev I.I.^{1,2}, Samtsov M.P.², Lyashenko L.S.³, Lugovski A.A.²

¹Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics

P. Brovka str., 6, Minsk, 220013, Belarus; e-mail: ivan2khl@mail.ru

²Institute of Applied Physical Problems named after A.N. Sevchenko Belarusian State University

Kurchatova str., 7, Minsk, 220045, Belarus

³ Belarusian State University

Independence ave., 4, Minsk, Belarus

Abstract. In this work, the influence of the chemical structure of a group of cationic polymethine photosensitizers synthesized in the spectroscopy laboratory of the Institute of Applied Physical Problems, them. Sevchenko BSU, on their distribution among serum proteins. Using the method of gel chromatography, it was established that the initial indotricarbocyanine dye PD154 binds mainly to serum albumin molecules. The chemical modification consisting in replacing the two carboxyl groups with polyethylene glycol molecules (300 kDa) leads to an increase in the affinity of PD220 for lipoproteins, and the use of an unsubstituted polymethine chain blocks the binding of PD222 to serum proteins. Spectral measurements have shown that in aqueous solutions of PD154 and PD220 dyes, a strong (20-25 nm) bathochromic peak of the absorption spectra is observed when blood serum is added. At the same time, the dye PD222 does not react to the presence of serum in the solution. Analysis of individual protein fractions stained with dyes showed a significant effect of the type of whey protein in the complex with polymethine dyes on the spectral characteristics of the latter. The appearance of a short-wave peak in the absorption spectra of the dye-albumin complexes was established. Possible biophysical mechanisms of the processes leading to the observed behavioral features of polymethine dyes in the presence of serum proteins, as well as the possibility of their use in biomedical purposes, are discussed.

Key words: polymethine photosensitizers, serum proteins.

АНАЛИЗ АДАПТАЦИИ ШКОЛЬНИКОВ К ОТДЫХУ В ДЕТСКИХ ЛАГЕРЯХ С ПОМОЩЬЮ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Баранов Д.Ю., Скуратовская И.В., Рогова О.В., Мухина Ю.В., Лантушенко А.О.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Поступила в редакцию: 26.07.2019

Аннотация. Изучение влияния факторов различного происхождения на человеческий организм с помощью микроядерного теста является перспективным направлением научных исследований. Работа посвящена анализу состояния генетического аппарата школьников, отдыхавших в МДЦ «Артек» и, как следствие, определению испытуемых, наиболее подверженных смене обстановки. Сбор микропрепаратов осуществлялся у детей разных возрастных групп и имеющих достижения в разных видах деятельности. Методом световой микроскопии был проведен анализ количества и характера ядерных нарушений. Проведена сравнительная характеристика и интерпретация полученных результатов.

Ключевые слова: световая микроскопия, микроядерный тест, клетки буккального эпителия, тест Шапиро-Уилка, Т-тест, U-тест.

Человеческий организм постоянно находится под воздействием множества факторов окружающей среды, имеющих как естественное (абиотические и биотические факторы), так и антропогенное происхождение. Человек не всегда может ощущать их воздействие на себе, но на клеточном уровне оно отражается практически сразу. В настоящее время активно изучается влияние факторов различной этиологии (антропогенного загрязнения, профессиональных болезней, различных видов излучения, образа жизни, ряда заболеваний, стресса и пр.) на генетический аппарат человека с помощью микроядерного теста буккального эпителия. Обсуждаются последствия влияния психоэмоционального стресса на генетическую систему организма. В тоже время, этот вопрос остается не до конца изученным.

Дети среднего и старшего школьного возраста могут быть подвержены стрессу по всевозможным причинам. К наиболее распространенным относятся [1]:

- необходимость заниматься внеурочной деятельностью, в т.ч. хобби;
- абиотическое воздействие, вызванное переменной климата;
- неблагоприятная психологическая обстановка в семье и классе;
- смена места жительства либо учебного заведения;
- нахождение в больнице, образовательном учреждении, детском оздоровительном лагере без присутствия родителей.

Исследование проводилось в рамках программы «Физика живых систем», реализуемой ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет» в ФГБОУ «Артек».

В качестве испытуемых выступили 2 группы школьников, по 10 человек в каждой. Возраст испытуемых – от 11 до 14 лет. В таблице 1 приведены основные сведения об испытуемых, полученные с помощью анкетирования. Сбор образцов осуществлялся по 2 раза в каждой группе.

Перед приготовлением препаратов испытуемые прополаскивали рот водой. Стерильным шпателем, делался соскоб слизистой оболочки щек выше линии смыкания зубов. Взятый материал наносился на стекло и сушился на воздухе. После этого проводилось окрашивание стекол красителем азури-эозином метиленовым синим по Романовскому-Гимзе: наносился краситель на стекло, которые впоследствии оставлялись сушиться на 10 мин. Затем проводилась промывка стекла дистиллированной водой. Затем уже окрашенные стекла снова оставляли сушиться на воздухе.

Таблица 1. Общие сведения об испытуемых

I смена				II смена			
Пол	№ п/п	Возраст	Вид деятельности	Пол	№ п/п	Возраст	Вид деятельности
М	1	13	спорт, отличник	Ж	1	14	танцы, спорт
	2	13	спорт	Ж	2	14	танцы
	3	12	спорт, музыка	Ж	3	14	спорт
	4	14	программирование, физ.-мат.	Ж	4	13	музыка
	5	13	парусный спорт, командир отряда	Ж	5	14	отличница
Ж	6	11	музыка	Ж	6	13	музыка
	7	12	танцы, отличница	М	7	12	спорт, командир отряда
	8	12	танцы	Ж	8	14	научная деятельность
	9	12	танцы, отличница	Ж	9	14	спорт, творчество
	10	12	танцы, отличница	М	10	13	танцы, спорт

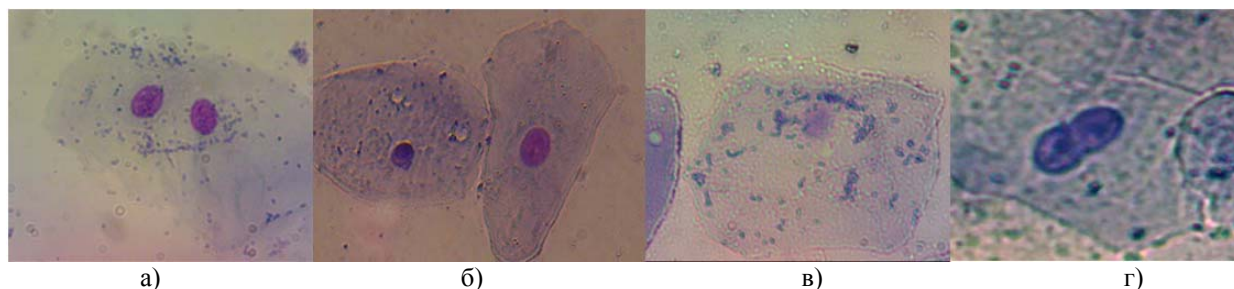


Рисунок 1. Клетки буккального эпителия доноров с некоторыми нарушениями: а) двуядерная клетка; б) кариопикноз; в) кариолизис; г) насечка

В конечном счете, был проведен анализ около 500 отдельно лежащих, с непрерывными краями, клеток методом световой микроскопии. Анализ микропрепаратов проводился на сертифицированном биологическом микроскопе исследовательского класса Микмед-6 с цифровой камерой МС6.3 от компании Ломо. Исследования осуществлялись в проходящем свете по методу светлого поля. Микрофотографии некоторых нарушений представлены на рисунке 1.

Данные были переведены в промилле и собраны по видам и категориям нарушений (согласно [2]) для дальнейшей обработки. По полученным значениям было проведено графическое представление данных (рис. 2, 3).

Согласно круговым диаграммам (рис. 2), среди нарушений наибольшая доля приходится на двуядерные клетки, относящиеся к пролиферативным показателям. Возможно, это связано с процессами активного клеточного деления в юном возрасте испытуемых. Цитогенетические нарушения имеют наименьшую долю от общего числа ядерных аномалий, что является признаком хорошего состояния испытуемых.

Интересно отметить, что наименьшее число ядерных нарушений было обнаружено у детей, занимающимися танцами. Возможно, это является следствием лучшей их адаптации к часто сменяющимся условиям и выступлениям перед публикой. Вероятно, они более стрессоустойчивы по сравнению с другими детьми. В обеих сменах командиры отрядов имеют большое количество нарушений, что может быть обусловлено дополнительными нагрузками.

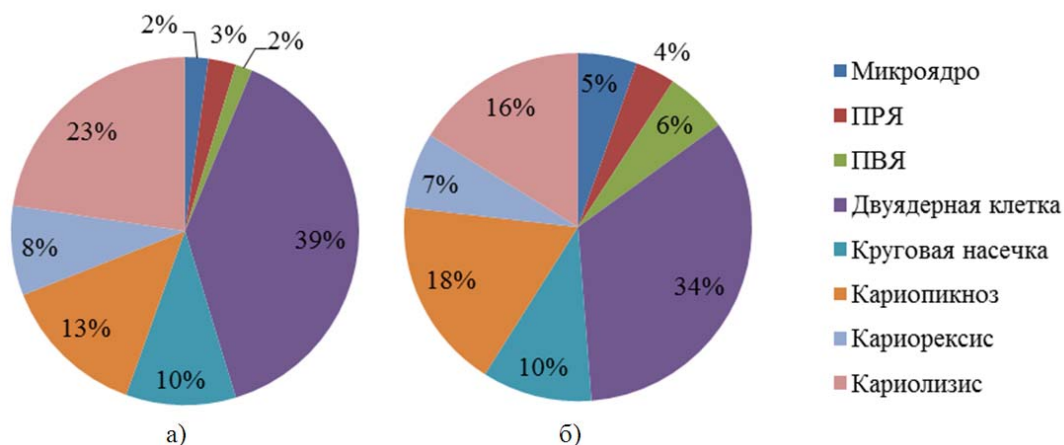


Рисунок 2. Соотношение между наблюдаемыми нарушениями: а – I смена; б – II смена

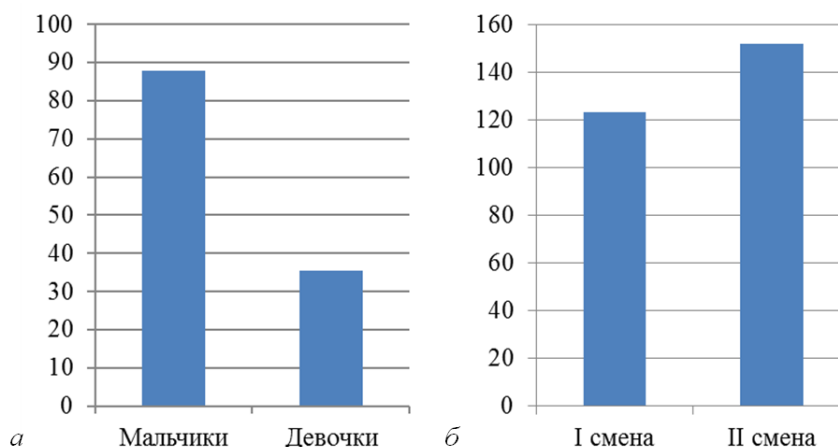


Рисунок 3. Гистограммы нарушений: а – по полу (I смена); б – по сменам

Из гистограмм выше (рис. 3) видно, что мальчики имеют большее число нарушений по сравнению с девочками, при этом у детей второй смены обнаружено большее число нарушений, чем в первой.

Для определения статистической достоверности результатов все дальнейшие расчеты проводились в программных пакетах для статистического анализа Statistica (StatSoft Co.) и SPSS (IBM). Проверка данных проводилась по 3 параметрам: пол, группа (смена) и вид деятельности (дети-танцоры и остальные).

Выборки были проверены на нормальность, что является начальным этапом статистической обработки экспериментальных данных. Для этого использовался критерий Шапиро-Уилка в связи с тем, что он является одним из наиболее эффективных критериев проверки нормальности и хорошо подходит для небольших выборок. При значении критерия меньше критического ($\alpha = 0,05$), распределение ненормально. Для данных, подчиняющихся нормальному распределению, был проведен Т-тест для независимых выборок (параметрический метод, T). Для данных, неподчиняющихся нормальному распределению, был проведен U-тест (непараметрический метод, U). Результаты представлены в таблице 2.

Исходя из таблицы выше, значение T , полученное параметрическим методом, превышает критическое для всех категорий и видов нарушений параметров «пол» и «смена». Для них же, выходные данные непараметрического теста имеют высокие значения U в подавляющем большинстве случаев, что отвергает достоверность различия выборок.

Однако для параметра «деятельность» наблюдаются малые значения критериев для деструкционной и пролиферационной категорий. Различие выборок с деструкционными нарушениями обусловлено, по большей части, за счет кариопикноза. Цитогенетические нарушения двух выборок не различимы по причине малой численности компонентов данной категории. Различие выборок пролиферационной категории обусловлено, в основном, различием выборок с двуядерными клетками. В конечном счете, различие выборок со всеми нарушениями достоверно.

Таким образом, выдвинутое ранее предположение о неравенстве состояний генетического аппарата по параметрам «пол» и «смена» при рассматриваемом уровне значимости не состоятельно. Объяснением этому, возможно, является неравенство длин выборок (для полов) и малое возрастное различие между группами (для смен). Напротив, предположение о неравенстве состояний генетического аппарата по «виду деятельности» статистически подтверждено.

Полученные данные вносят вклад в решение задачи оптимизации психофизиологического состояния детей, отдыхающих в детских лагерях. Результаты данной работы могут быть учтены при создании методик снижения риска эмоциональных срывов детей.

Таблица 2. Результаты Т- и U-тестов

Нарушение	Пол	Смена	Деятельность
Все	0.10 (T)	0.33 (T)	$5.25 \cdot 10^{-4}$ (T)
Цитогенетические	0.63 (U)	0.01 (U)	1.00 (U)
Пролиферационные	0.60 (T)	0.69 (T)	$8.15 \cdot 10^{-4}$ (T)
Деструкционные	0.08 (T)	0.16 (U)	0.02 (T)
Микроядро	0.45 (U)	0.10 (U)	0.39 (U)
Протр. «Разбитое яйцо»	0.87 (U)	0.31 (U)	1.00 (U)
Протр. «Высунутый язык»	0.66 (U)	0.03 (U)	0.44 (U)
Двуядерная	0.53 (T)	0.78 (T)	$4.9 \cdot 10^{-4}$ (U)
Круговая насечка	1.00 (U)	0.57 (U)	0.12 (U)
Кариопикноз	0.49 (T)	0.11 (T)	0.57 (T)
Кариорексис	0.30 (U)	0.73 (U)	0.07 (U)
Кариолизис	0.18 (U)	0.47 (U)	0.10 (U)

Список литературы / References:

1. Баранов Д.Ю. Исследование влияния различных факторов на клетки буккального эпителия школьников с помощью микроядерного теста. *Вестник науки и образования*, 2019, № 9(63), ч. 4, с. 11-14. [Baranov D.Yu. The study of the influence of various factors on the cells of buccal epithelium of schoolchildren using micronucleus test. *Bulletin of Science and Education*, 2019, no. 9(63), part 4, pp. 11-14. (In Russ.)]
2. Калаев М.С. Нечаева В.Н., Калаева Е.А. *Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: монография*. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016, 136 с. [Kalayev M.S. Nechaeva V.N., Kalayeva E.A. *Micronuclear test of buccal epithelium of the human oral cavity: monograph*. Voronezh: VSU Publishing House, 2016, 136 p. (In Russ.)]

ANALYSIS OF ADAPTATION OF PUPILS TO REST IN CHILDREN'S CAMPS BY MICRONUCLEUS TEST OF BUCCAL EPITHELIUM**Baranov D.Yu., Skuratovskaya I.V., Rogova O.V., Mukhina Yu.V., Lantushenko A.O.**

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia, e-mail: lantushenko@mail.ru

Abstract. The study of the influence of different factors on human body by using micronucleus test is a promising area of science. The research is devoted to investigation of the consequences of staying schoolchildren in ICC "Artek" on their genetic apparatus and the definition of the people, the most exposed to a change of situation. Collection of samples was carried out in children of different age groups and with achievements in different activities. Then quantity and quality of abnormal cells were identified by using light microscopy. The comparative characteristics and interpretation of the results are carried out.

Key words: *light microscopy, micronucleus test, buccal cells, Shapiro-Wilk test, T-test, U-test.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ МИКРОГЕМОДИНАМИКИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА КРОВИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНГАЛЯЦИОННОГО ОКСИДА АЗОТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Перетягин П.В., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Бояринов Г.А., Сергиенко В.И.

Приволжский исследовательский медицинский университет

Верхне-Волжская наб., 18, г. Нижний Новгород, 603155, РФ; e-mail: peretyaginpv@gmail.com

Поступила в редакцию: 28.07.2019

Аннотация. В работе представлены результаты исследования микроциркуляторного русла и параметров окислительного метаболизма крови интактных животных, подвергнутых продолжительному ингаляционному воздействию оксида азота при концентрациях 20ppm, 50ppm и 100ppm. Эксперимент выполнен на крысах линии Wistar. Ингаляции NO осуществляли в течение 30 дней. Состояние микроциркуляции и окислительного метаболизма крови оценивали через 30 суток и спустя восстановительный период после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток). Методом лазерной доплеровской флоуметрии исследовали функционирование микрососудов кожи по уровню перфузии. В плазме крови и эритроцитах изучали интенсивность перекисного окисления липидов с помощью метода индуцированной биохемилюминесценции и уровня малонового диальдегида. В гемолизате эритроцитов определяли активность супероксиддисмутазы. Установлено, что оптимальной концентрацией для ингаляционного применения NO является 20ppm, при использовании которой отмечено увеличение перфузии, а также максимальное повышение общей антиоксидантной активности через 30 суток и нормализация перекисного окисления липидов в крови через 60 суток после использования NO. Большие концентрации оксида азота (50ppm и 100ppm) оказали иницирующее влияние на микроциркуляцию и перекисное окисление липидов в эритроцитах и плазме крови после отмены воздействия NO на протяжении 60 суток, активируя при этом каталитические свойства супероксиддисмутазы.

Ключевые слова: оксид азота, ингаляции, микроциркуляция, перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза.

Патогенез большинства заболеваний включает избыточную активацию свободно-радикальных процессов, нарушение функционирования систем антиоксидантной защиты, что неизбежно приводит к формированию в организме окислительного стресса. В связи с этим поиск и разработка способов коррекции окислительного стресса являются крайне актуальной проблемой современной медицины. С саногенетическими целями в биологии и медицине применяют активные формы кислорода, в том числе оксид азота (NO) [1]. В настоящее время показано, что NO – важный регулятор активности внутриклеточных ферментов, функций ряда органов и тканей, в том числе свертывания крови и защитных реакций организма. Выявлено, что NO является нейромедиатором центральной и периферической нервных систем, участвует в регуляции сосудистого тонуса, как медиатор вазодилатации, а также в регуляции общего объема циркулирующей крови, скорости системного кровотока и уровня артериального давления. [2]. Биологические эффекты оксида азота зависят от его концентрации, наличия ферментов-мишеней в клетке, продуктов, которые образуются в результате взаимодействия NO с кислородом [3]. Однако, ингаляция оксида азота – процедура, которая при передозировке NO может привести к развитию тяжелых осложнений за счет образования ряда высокотоксичных соединений (альдегидов, кетонов, спиртов), накопление которых вызывает повреждение мембраносвязанных ферментов, нарушение мембранного транспорта и гибель клеток [4]. Токсический эффект оксида азота обусловлен тем, что его применение как и любых активных форм кислорода инициирует свободно-радикальное окисление (СРО), активирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) биологических мембран, направленных на адаптивное повышение клеточной проницаемости. Поэтому использование окислительных методов терапии, в частности, NO неразрывно связано с необходимостью исследования процессов липопероксидации, так как изменение баланса про- и антиоксидантных систем организма является одним из диагностических критериев тяжести патологического состояния, характеризуя формирование и прогрессирование окислительного и нитрозативного стресса [1].

В связи с этим, целью данной работы явилась оценка влияния длительного применения оксида азота в концентрациях 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm на параметры окислительного метаболизма и состояние микроциркуляторного русла крыс.

Исследование проведено на 38 крысах-самцах Wistar, разделенных на группы: группа 1 (n = 8) – интактные животные, без воздействий, группы 2, 3, 4 (n = 5 в каждой) – животные, подвергнутые ежедневному ингаляционному воздействию оксида азота (экспозиция = 10 мин.) с концентрацией 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm соответственно в течение 30 дней, группы 5, 6 и 7 – опытные (по n=5 в каждой), животные которых на протяжении 30 суток ежедневно ингалировали по 10 минут NO в концентрациях 20ppm, 50ppm и 100ppm и затем 30 суток не подвергали манипуляциям. Крыс 2, 3 и 4 групп выводили из эксперимента на 30-е сутки путем декапитации под наркозом (Золетил + Ксила), животных 5, 6, 7 групп – на 60-е сутки. Синтез газовой смеси производили с помощью экспериментального аппарата для генерации NO (РФЯЦ-ВНИИЭФ, г. Саров).

Таблица 1. Значения параметров микроциркуляции животных при длительных ингаляциях оксида азота

Параметр	Интактные крысы	20 ppm		50 ppm		100 ppm	
		30 суток	60 суток	30 суток	60 суток	30 суток	60 суток
ПМ, перф.ед.	9,6	11,3*	12,1*	10,8*	11,5*	10,2	10,9*
Э, усл.ед.	12,9	13,7	14,5*	13,4	13,8	13,5	13,9
Н, усл.ед.	9,1	10,2*	10,7*	9,8	10,3*	9,6	10,2*
М, усл.ед.	8,4	9,6*	9,8*	9,3	9,6*	9,1	9,5*
Д, усл.ед.	5,8	5,7	5,2*	6,1	5,9	6,0	5,8
С, усл.ед.	3,3	4,1*	4,4*	3,8*	4,2*	3,9*	4,3*
ПШ, перф.ед.	1,1	1,3*	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$)

Посредством анализатора кровотока ЛАКК-М (исп.2) (НПП «ЛАЗМА», Россия) были получены значения показателя микроциркуляции (ПМ), регуляторных факторов (эндотелиального (Э), нейрогенного (Н), миогенного (М), дыхательного (Д), сердечного (С)), а также показателя шунтирования (ПШ). В крови, стабилизированной цитратом натрия, исследовали интенсивность свободно-радикального окисления (СРО) и общую антиоксидантную активность (ОАА) на БХЛ-10 (Н.Новгород), определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Результаты обрабатывали с помощью Statistica 6.0.

Длительное применение оксида азота (на протяжении 30 суток) путём ежедневного ингаляционного воздействия разными дозами NO (20 ppm, 50 ppm, 100 ppm) сопровождалось интенсификацией объёмного микрокровотока. Применение для ингаляций оксида азота в концентрации 20 ppm через 30 суток привело к возрастанию микроциркуляции на 17% от физиологических значений (табл. 1). При увеличении концентрации NO в ингаляционном потоке ответные сосудистые реакции дозозависимо убывали: при концентрации NO 50 ppm показатель микроциркуляции составлял 112%, а при концентрации 100 ppm – 106% от уровня, характерного для интактных животных.

Большинство регуляторных факторов возрастало в ответ на применение всех концентраций оксида азота, однако наиболее явным был рост нейрогенного, миогенного и сердечного компонентов на 12%, 14% и 24%, соответственно, при воздействии соединения с концентрацией 20 ppm. Увеличение амплитуд миогенной и сердечной регуляции свидетельствовало о происходящих процессах вазодилатации на фоне возрастающего притока артериальной крови. Роль шунтирующих микрососудов не получила явного проявления при всех изучаемых концентрациях, что свидетельствовало об оптимальном задействовании нутритивных сосудов микроциркуляторного звена. После отмены воздействий (60 суток) отмечено минимальное снижение показателей активной и пассивной регуляции микрокровотока.

Исследование процессов липопероксидации в плазме крови животных показало снижение светосуммы хемилюминесценции при использовании NO на протяжении 30 суток в концентрации 20 ppm на 10%, при 50 ppm – на 24% по сравнению с интактными животными (табл. 2). На протяжении восстановительного периода после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток) отмечено усиление процессов липопероксидации при использовании всех концентраций NO: при 20 ppm показатель S увеличился на 22%, при 50 ppm – на 71%, при 100 ppm – на 44% по сравнению с аналогичными параметрами на 30-е сутки. Перекисное окисление в плазме под влиянием ингаляций оксида азота через 60 суток оказалось выше показателя здоровых животных при 20 ppm NO на 9%, при 50 ppm NO – на 29%, при 100 ppm NO – на 41%.

Таблица 2. Динамика изменения биохимических показателей в крови крыс при хроническом воздействии оксида азота

Параметр	Интактные крысы	20 ppm		50 ppm		100 ppm	
		30 суток	60 суток	30 суток	60 суток	30 суток	60 суток
S, усл.ед., плазма	11,4	10,3	12,6**	8,6*	14,7*.*	11,1	15,9*.*
S, усл.ед., эритроциты	9,1	4,3*	11,4*.*	5,2*	11,7*.*	4,8*	9,4**
МДА, мкмоль/л, плазма	0,9	0,6*	0,4*.*	0,7*	0,2*.*	0,8*	0,3*.*
МДА, мкмоль/л, эритроциты	6,1	5,9	5,5	6,5	7,2*	7,2*	8,9*.*
tg2α, усл.ед., плазма	0,8	0,9*	0,8	0,8	0,7*	0,7*	0,8**
СОД	917,3	990,8	1664,6*.*	1421,4*	1631,3*.*	1295,3*	1889,1*.*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с 30 сутками ($p < 0,05$)

В эритроцитах по данным хемилюминесценции выявлено статистически значимое снижение ПОЛ через 30 суток после применения всех используемых концентраций NO: при 20 ppm – на 52%, при 50 ppm – на 45%, при 100 ppm – на 47% по сравнению с контрольной группой крыс (табл. 2). Уменьшение интенсивности липопероксидации в эритроцитах под влиянием оксида азота свидетельствует о повышении резистентности мембран к воздействию перекиси водорода, но в условиях длительной NO интоксикации может привести к нарушениям в биологических мембранах, связанным с изменением их проницаемости, ионного транспорта и физико-химических свойств мембранных белков и липидов, изменением активности мембранно-связанных ферментов, понижением электрической стабильности липидного бислоя мембран. После ингаляций оксида азота с концентрациями 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm, соответственно, у животных в восстановительном периоде (через 60 суток) отмечено повышение светосуммы хемилюминесценции в эритроцитах при концентрации 20 ppm в 2,6 раза, при 50 ppm – в 2,4 раза, при 100 ppm – в 2 раза по сравнению с показателями крыс, получавших ингаляции NO на протяжении 30 суток. При этом параметр S спустя 60 суток после воздействия оксида азота оказался выше значений S здоровых животных при использовании 20ppm NO на 26%, при 50 ppm – на 30%, при 100 ppm – на 4%, что свидетельствует об интенсификации кислородзависимых процессов, обуславливающих свободнорадикальное окисление мембран эритроцитов. Таким образом, длительное применение NO (30 суток) оказывает ингибирующее влияние на интенсивность ПОЛ в плазме и эритроцитах крови. Выявлено, что оксид азота обладает выраженными прооксидантными свойствами, проявляющимися в отдаленные сроки после воздействия спустя 60 суток, NO активирует СРО в плазме при использовании высоких концентраций (50 ppm, 100 ppm) и в эритроцитах при влиянии 20 ppm и 50 ppm NO. Одним из механизмов повреждающего действия оксида азота на биологические мембраны является образование инициаторов перекисного окисления липидов (пероксинитрита, гидроксильного радикала, синглетного кислорода), в результате чего создаются условия для активации процессов ПОЛ. Основным токсическим эффектом обладают высокореактивные гидроксильные радикалы, концентрация которых возрастает при увеличении количества оксида азота.

Снижение общего уровня прооксидантного баланса на фоне длительного воздействия оксида азота (30 суток) подтверждали также данные определения промежуточного продукта ПОЛ – малонового диальдегида – в плазме: уровень МДА у животных 2, 3 и 4 групп уменьшился при использовании NO в концентрации 20 ppm – на 43%, при 50 ppm – на 31%, при 100 ppm – на 28% по сравнению со здоровыми крысами (табл. 2). При этом отмечен рост содержания МДА в эритроцитах при ингаляционно-наружном применении оксида азота на протяжении 30 суток в концентрации 100 ppm на 19% по сравнению с контролем (табл. 2). В восстановительном периоде (через 60 суток) после ингаляций оксида азота у животных 5, 6 и 7 группы концентрация МДА в плазме снизилась при использовании 20 ppm NO на 25%, при 50 ppm – в 3,2 раза, при 100 ppm – в 3 раза по сравнению с показателями крыс 2, 3 и 4 групп соответственно, оказавшись ниже значений здоровых животных при 20 ppm в 2,3 раза, при 50 ppm – в 4,7 раза, при 100ppm – в 4 раза (табл. 2). В эритроцитах уровень МДА вырос через 60 суток после воздействия 50 ppm на 12%, при 100 ppm – на 25% по сравнению со показателями крыс, ингалировавшихся 30 суток, превысив значения здоровых крыс при 50 ppm на 19%, при 100 ppm NO – на 48% (табл. 2).

Выявленные изменения прооксидантного статуса, обусловленные хроническим ингаляционно-наружным воздействием оксида азота, находятся в тесной взаимосвязи с состоянием антиоксидантной системы защиты. Показано, что длительное ингаляционно-наружное воздействие NO (30 суток) привело к росту общей антиоксидантной активности плазмы крови при применении концентрации 20 ppm на 29%, при использовании 50 ppm – на 8%, при 100 ppm NO – на 4% по сравнению с показателями интактных животных (табл. 2). Известно, что при низких концентрациях оксид азота ведет себя как антиоксидант, так как является отрицательным модулятором НАДФН-оксидазы, продуцирующей одну из активных форм кислорода – H_2O_2 , а также может реагировать с радикалами органических соединений, обрывая цепные реакции, что привело к снижению светосуммы хемилюминесценции в плазме и эритроцитах через 30 суток после воздействия 20 ppm NO. При этом на 60-е сутки эксперимента антиоксидантные резервы, оцениваемые по значению показателя tg 26, нормализовались: АОА плазмы крови при использовании 20ppm NO снизилась на 19% по сравнению с 30 сутками.

Исследование удельной активности супероксиддисмутазы, фермента первой линии антиоксидантной защиты, выявило повышение активности СОД через 30 суток после ингаляционно-наружного воздействия NO в концентрации 20 ppm, 50 ppm и 100 ppm на 8%, 55% и 41% соответственно по сравнению с показателем интактных животных, что обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от образующихся высокотоксичных кислородных радикалов (табл. 2). В восстановительном периоде (через 60 суток) после ингаляций NO у крыс 5, 6 и 7 групп отмечены повышенные значения удельной активности СОД и по сравнению с показателями крыс, подвергнутых воздействию NO на протяжении 30 суток (при 20 ppm – на 68%, при 50 ppm – на 15%, при 100 ppm – на 46%), и по сравнению с контролем (при 20ppm – на 81%, при 50 ppm – на 78%, при 100 ppm – в 2 раза).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о наличии дозозависимого действия ингаляционного применения моно оксида азота на микроциркуляцию. Причем наиболее оптимальный ответ микроциркуляторного русла выявлен при использовании низкой концентрации соединения (20 ppm), при котором выявлено более выраженное его стимулирующее влияние на объёмный микрокровоток (30 суток) с сохранением эффекта после отмены воздействия (60 суток). Длительное применение оксида азота также

вызывает повышение фермента первого звена антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы эритроцитов крови через 30 суток после воздействия NO и в восстановительном периоде после отмены окислительных нагрузок NO (60 суток). Отмечено снижение интенсивности перекисного окисления липидов в плазме крови крыс по данным биохемилюминесценции и по концентрации малонового диальдегида при ингаляционно-наружном применении оксида азота на протяжении 30 суток. Показано, что оптимальной дозой для ингаляционного применения оксида азота может быть 20 ppm, при использовании которой отмечено повышение общей антиоксидантной активности через 30 суток после воздействия NO и нормализация перекисного окисления липидов в плазме (по данным биохемилюминесценции) и эритроцитах (по концентрации малонового диальдегида) после периода восстановления (через 60 суток) от использования оксида азота. Большие концентрации оксида азота (50 ppm и 100 ppm) при длительном хроническом его применении инициировали процессы СРО после отмены воздействия NO спустя 60 суток в эритроцитах (по уровню МДА) и плазме (по показателю светосуммы хемилюминесценции), проявляя при этом активирующее влияние на активность супероксиддисмутазы.

Список литературы / References:

1. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*. М.: Фирма "Слово", 2006, 556 с. [Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. *Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants*. M.: Firm "Word", 2006, 556 p. (In Russ.)]
2. Bajrovic F. et al. The contribution of lumbal sympathetic neurones activity to rats skin blood flow oscillation. *European Journal of Physiology*, 2000, vol. 439, pp. R158-R159.
3. Kincella J.P. Early inhaled nitric oxide therapy in premature newborns with respiratory failure. *New England Journal*, 2006, vol. 355, pp. 354-364.
4. Kumar P. et al. Use of inhaled nitric oxide in preterm infants. *Pediatrics*, 2014, vol. 133, no. 1, pp. 164-170.

STUDY OF LOCAL MICROHEMODYNAMICS AND OXIDATIVE METABOLISM OF BLOOD UNDER LONG-TERM EXPOSURE TO INHALED NITRIC OXIDE IN THE EXPERIMENT

Peretyagin P.V., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Boyarinov G.A., Sergienko V.I.

Volga Research Medical University

Verkhne-Volzhsкая dr., 18, Nizhniy Novgorod, 603155, Russia; e-mail: peretyaginpv@gmail.com

Abstract. The paper presents the results of a study of the microcirculatory bed and parameters of oxidative blood metabolism of intact animals exposed to prolonged inhalation of nitric oxide at concentrations of 20 ppm, 50 ppm and 100 ppm. The experiment was performed on Wistar rats. No inhalations were carried out within 30 days. The state of blood microcirculation and oxidative metabolism was assessed 30 days later and the recovery period after the cancellation of oxidative loads NO (60 days). Laser Doppler flowmetry was used to study the functioning of skin microvessels in terms of perfusion. The intensity of lipid peroxidation was studied in blood plasma and erythrocytes using the method of induced biochemiluminescence and the level of Malon dialdehyde. The activity of superoxide dismutase was determined in erythrocyte hemolysate. It was found that the optimal concentration for inhalation use of NO is 20 ppm, which was used to increase perfusion, as well as the maximum increase in total antioxidant activity in 30 days and normalization of lipid peroxidation in the blood 60 days after use of NO. High concentrations of nitric oxide (50 ppm and 100 ppm) had an initiating effect on microcirculation and lipid peroxidation in erythrocytes and blood plasma after the cancellation of NO exposure for 60 days, activating the catalytic properties of superoxide dismutase.

Key words: *nitric oxide, inhalation, microcirculation, lipid peroxidation, Malon dialdehyde, superoxide dismutase.*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДОРΟΣЛЕЙ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ АКУСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИДОННОГО СЛОЯ ВОД МОРЕЯ

Ластовенко О.Р., Лисютин В.А.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. Биологические процессы, связанные с водорослями могут сильно повлиять на распространение звука в прибрежных районах, где присутствуют луга водорослей. Акустический эффект обусловлен производством растениями пузырьков, которые могут оказать влияние на способность обнаружения объектов и на возможности донного картирования гидролокаторами вследствие увеличения помех. В работе использованы данные измерений скорости звука и коэффициента затухания в придонном слое воды и пограничном слое дна, опубликованные в научной литературе. В среде с пузырьками газа частотные зависимости скорости звука и затухания имеют специфичный вид. Приводится дисперсионное уравнение GSED+g теории. Рассматриваются и анализируются дополнительные источники дисперсии и виды потерь, свойственные газонасыщенным средам. В рамках GSED+g теории распространения упругих волн в газонасыщенных морских осадках по измеренным частотным зависимостям скорости звука и коэффициента затухания восстанавливаются физические свойства газонасыщенного придонного водного слоя и пограничного слоя дна.

Ключевые слова: дисперсия скорости звука, газонасыщенные морские осадки, коэффициент затухания.

ВВЕДЕНИЕ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Биологические процессы, связанные с водорослями могут сильно повлиять на распространение звука в прибрежных районах, где присутствуют луга водорослей. Акустический эффект обусловлен производством растениями пузырьков, которые могут оказать существенное влияние на способность обнаружения объектов и на возможности донного картирования гидролокаторами вследствие увеличения помех за счет отражения, поглощения и рассеяния звука [1]. Методы акустического дистанционного зондирования были использованы для мониторинга биологических маркеров, таких как фотосинтетическая активность морских водорослей, оценка здоровья морских экосистем [1, 2]. Газ, генерируемый фотосинтетической активностью морских водорослей, может растворяться непосредственно в окружающей морской воде или образовывать пузырьки, цепляющиеся за края листьев. Показано, что генерация газа морскими водорослями является переменной во времени. Более короткие (суточные) и более длительные временные интервалы (сезонные и более) указывают, что возможные акустические аномальные эффекты также зависят от времени. В дополнение к газонасыщенному листу ткани в толще воды, корневища также содержат аэренхиму (газонаполненные каналы), которые способствуют диффузии кислорода в окружающие корни морские осадки. Плотность и модули упругости самих растений могут также потенциально влиять на распространение звука путем изменения эффективных свойств материала на границе раздела вода-осадки и внутри морского дна [1, 2].

Целью настоящей работы является восстановление акустических характеристик придонного слоя воды и переходного слоя морских осадков при отсутствии и при наличии слоя водорослей с помощью GSED теории распространения упругих волн в морских осадках [3, 4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы результаты экспериментов, опубликованные в [2]. Эксперименты проводились в восточной части залива Корпус-Кристи, штат Техас, США, в районе, где произрастают водоросли вида *Thalassia testudinum*. В период активного роста густой, пышный полог распространяется в толщу воды на 30 см от границы осадки/вода, и обильные пузырьки фотосинтеза наблюдаются в толще воды. Для сравнения, во время спящего сезона слой водорослей намного более редок и простирается всего на 5-10 см от осадков, а пузырьков от фотосинтетической активности не наблюдается. Глубина воды на месте эксперимента составляла около 1 м. В ходе акустических измерений температура и соленость воды контролировались так, чтобы можно было рассчитать скорость звука в воде. Сначала был проведен ряд измерений в воде над областью голого осадка для получения акустической калибровки в морской воде. Затем измерения проводились на глубинах от 5 см до 20 см с шагом 5 см ниже граница раздела вода-осадки в области голых осадков. Затем измерительная система была перемещена в ложе водорослей в нескольких метрах и измерения проводились над осадками, в пределах полога водорослей, и затем на тех же глубинах под границей вода-осадки [2]. Четыре керна были собраны на участках голых осадков и участках с водорослями для определения типа осадков и определения биомассы ниже границы раздела. Керны были погружены в осадки на глубину примерно от 20 см до 25 см.

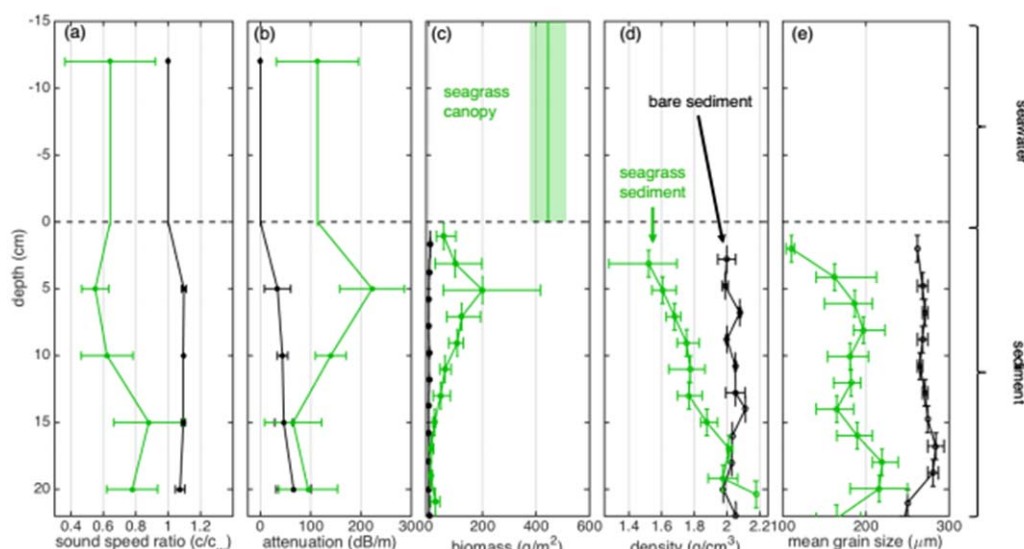


Рисунок 1. Зависимость от глубины акустических и физических характеристик в слое *Thalassia testudinum* (сплошные зеленые линии) по сравнению с теми же измерениями на участке без водорослей, голые осадки (сплошные черные линии). Отрицательные значения глубины указывают расположение в водном слое, положительные – в слое осадков. Частота 50 кГц. Взято из [2]

Результаты измерений акустических и физических характеристик вдоль вертикали, захватывающей водный слой и слой осадков на одной частоте приведены на рисунке 1. На рисунке 2 показаны вертикальные профили скорости звука и затухания, измеренные на трех частотах, что позволяет выявить дисперсию – самый интересный параметр.

ПРИЛОЖЕНИЕ GS+ED+G ТЕОРИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЗВУКА В МОРСКИХ ОСАДКАХ

Теория. В первом приближении, без дисперсии, скорость звука в любой среде определяется упругими и инерционными свойствами среды согласно формуле [3, 4]:

$$c_0 = \sqrt{\frac{K_m}{\rho_m}}, \quad (1)$$

где ρ_m , K_m – равновесные плотность и модуль упругости среды.

Если среда состоит из нескольких компонент (водный слой – вода, ткань водорослей и газ, дно – вода, ткань водорослей, твердая компонента и газ), состав среды описывается многокомпонентной моделью. Скорость распространения продольных волн c_0 в многокомпонентной среде будет выражаться через равновесные по объему значения плотности ρ_m и сжимаемости K_m^{-1} в соответствии с (1), только плотность и сжимаемость следует вычислять суммированием соответствующих парциальных компонент среды

$$\rho_m = \phi_1 \rho_1 + \phi_2 \rho_2 + \phi_3 \rho_3 + \dots, \quad \frac{1}{K_m} = \frac{\phi_1}{K_1} + \frac{\phi_2}{K_2} + \frac{\phi_3}{K_3} + \dots, \quad (2)$$

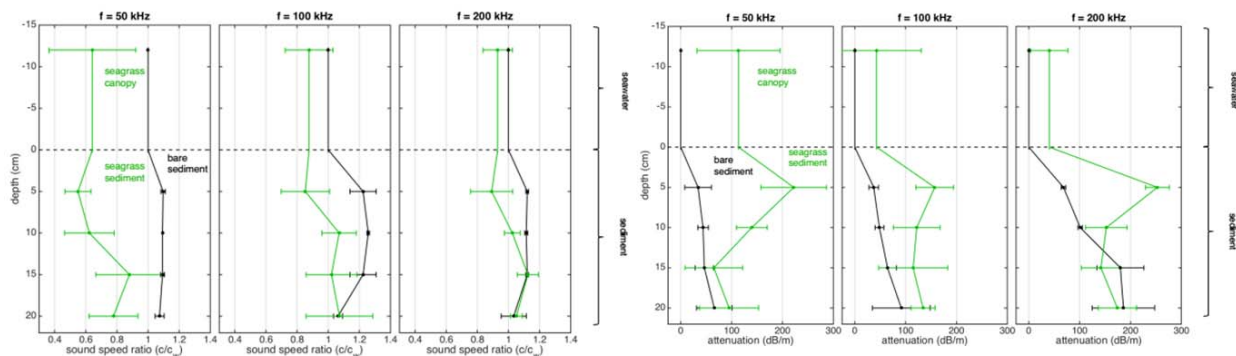


Рисунок 2. Результаты измерений скорости звука и затухания на частотах 50 кГц, 100 кГц и 200 кГц во время активного сезона роста на участке голых отложений (черный) и на участке морских водорослей (зеленый). Взято из [2]

где $\phi_{1,2,3} = V_{1,2,3}/V$ – относительный объем составляющих, причем $\phi_1 + \phi_2 + \phi_3 = 1$, V – полный объем среды. Таким образом, скорость звука в трехкомпонентной среде из твердой фазы, воды и газа будет равна

$$c_{0sat} = \left[\left((1-P)\rho_g + (P-S)\rho_f + S\rho_a \right) \left((1-P)K_g^{-1} + (P-S)K_f^{-1} + SK_a^{-1} \right) \right]^{-1/2}, \quad (3)$$

где P – пористость (если дно); S – сатурация среды газом (объемная доля); $\rho_{f,g,a}$, $K_{f,g,a} = \rho_{f,g,a} c_{f,g,a}^2$ – плотности и модули упругости флюида вместе с тканью водорослей, твердой фазы и газа соответственно. Заметим, что упругость газа это есть давление.

Коэффициент затухания α_p , Нп/м, входит в формулу для комплексного волнового числа

$$k_p = \frac{\omega}{c_p} - i\alpha_p = \frac{\omega}{c_p} (1 - i\beta_p),$$

где c_p – фазовая скорость звука; $\beta_p = \frac{\alpha_p c_p}{\omega}$ – тангенс потерь. Коэффициент затухания обычно измеряют в дБ/м, α_p , дБ/м = $8,69\alpha_p$, Нп/м.

Комплексная фазовая скорость согласно GSED теории дается дисперсионным уравнением [3]

$$\tilde{c}_p = \sqrt{\frac{K_m + \gamma_p (i\omega)^n}{\rho_{eff}}}, \quad \rho_{eff} = \rho_m - \phi \rho_f F_C(w), \quad (4)$$

где γ_p , Па – модуль межгранулярной жесткости; n – показатель стресс-релаксации; ϕ – перколяционная пористость – внутренний параметр теории, устанавливающий баланс между силами внутреннего и вязкого

трения; $F_C(w) = 1 - \frac{2J_1(i^{3/2}w)}{i^{3/2}wJ_0(i^{3/2}w)}$ – функция частотной коррекции, отражающая отличия характера

течений в порах от течения Пуазейля; $w = \sqrt{\frac{a^2 \rho_f}{\eta}} \omega$, $J_{0,1}$ – функции Бесселя; η – динамическая вязкость жидкости, Па·с; a – радиус цилиндрической поры.

Вещественные скорость звука c_p и коэффициент затухания α_p могут быть получены из комплексных фазовых скоростей как $c_p = \text{Re}(\tilde{c}_p)$, $\alpha_p = -\omega \text{Im}(\tilde{c}_p^{-1})$, Нп/м.

Модель GS+ED разработана для двухкомпонентных (вода + твердая фаза) сред и учитывает только два вида потерь: внутреннее (межгранулярное) и вязкое трение. При сатурации среды газом к перечисленным потерям добавляются специфичные, связанные с реологическими (резонансными) эффектами в пузырьковой среде [5].

Модифицированное дисперсионное уравнение для газонасыщенной среды имеет вид:

$$\tilde{c}_{pbubble} = \sqrt{\frac{K_m + \gamma_p (i\omega)^n}{\rho_{eff} + \Delta\rho}}, \quad (5)$$

где $\Delta\rho = (K_m + \gamma(i\omega)^n)Y$, $Y = 4\pi\omega^2 \int_0^\infty \frac{R_0 N(R_0)}{\omega_0^2 - \omega^2 + 2iB_{tot}\omega} dR_0$ – интеграл, характеризующей резонансную

дисперсию и дополнительные суммарные потери B_{tot} , и зависящий от: $R_0 N(R_0)$ – числа пузырьков в единице объема, радиус которых заключен в пределах от R_0 до $R_0 + dR_0$; ω_0 – резонансная частота пузырька; B_{tot} – суммарные реологические потери. В случае монодисперсной популяции пузырьков, величина

$$Y = \frac{4\pi R_0 C}{\omega_0^2 - \omega^2 + 2iB_{tot}\omega}, \quad (6)$$

где $C = S/V_0$ – концентрация пузырьков, $V_0 = 4/3\pi R_0^3$.

Резонансная частота пузырька определяется формулой $\omega_0^2 = \frac{A_0 - B_0 + C_0}{m_0}$, где $m_0 = \rho_m R_0^2 + 4R_0\mu/c_0$

– эффективная масса пузырька, μ – коэффициент касательного трения при пульсации пузырька; $A_0 = 3p \operatorname{Re}(F_p)$, $p = 10^5 + \rho_f gh + \rho_m gd + 2\tau/R_0$ – равновесное гидростатическое давление внутри пузырька, $g = 9,81$ м/с², h – глубина воды, d – глубина в слое осадков, τ – коэффициент поверхностного натяжения; F_p – комплексная функция политропы; $B_0 = 2P\tau/R_0$; $C_0 = 4G(1-P)$, G – вещественный коэффициент касательного механического напряжения. Комплексная функция политропы имеет вид

$$F_p = \frac{3\gamma}{1 - 3iL_T(\gamma - 1) \left[(i/L_T)^{1/2} \left(\coth \left((i/L_T)^{1/2} \right) \right) - 1 \right]},$$

где $\gamma = C_p/C_V$ – отношение молярных теплоемкостей; $L_T = \chi/R_0^2/\omega_0$ – характерная глубина проникновения термодиффузии, χ – температуропроводность [5].

Суммарные реологические потери определяются формулой $B_{tot} = B_{vis} + B_{th} + B_{int} + B_{el} + B_{ac} + B_{rad}$ и включают шесть компонент: $B_{vis} = 2P\mu/m_0$ – сдвиговые потери в окружающей пузырек среде при его пульсации; $B_{th} = 3p \operatorname{Im}(F_p)/(2m_0\omega)$ – тепловые потери из-за неадиабатичности процесса в микронеоднородной среде (микроскопически, в масштабах размеров зерен и пузырьков процесс распространения звука будет неадиабатичен, большой теплообмен на малых частотах и малый теплообмен на больших частотах); $B_{int} = -P\tau/m_0/c_{psat}$ – внутренние потери, связанные с выполнением работы против сил поверхностного натяжения; $B_{el} = 2G(1-P)R_0/m_0/c_{psat}$ – упругие внутренние потери, связанные с деформацией внешней для пузырька поверхности, охваченной гранулами среды, если между гранулами есть трение или они связаны скелетом; $B_{ac} = R_0 \operatorname{Re}(k_{psat})\omega/2/(1 + \operatorname{Re}(k_{psat})R_0)^2$ – акустические потери, связанные с рассеянием на пузырьках; $B_{rad} = \rho_m R_0^3 \omega^2/2m_0/c_{psat}$ – потери на дипольное излучение пульсирующего пузырька [5].

Дисперсия и затухание звука в водном слое. Обычно, затуханием звука в воде пренебрегают (чисто вязкое затухание проявляется в воде на мегагерцовых частотах или на тысячекилометровых дистанциях), и считают плотность и упругость воды вещественными. Однако, в случае распространения звука в слое водорослей, как видно из рис.1 и рис.2, скорость звука значительно уменьшается, а затухание возрастает до 114 дБ/м! Кроме того, как видно из рис.2, регистрируется значительная дисперсия и зависимость коэффициента затухания от частоты.

В воде с водорослями можно представить следующие источники дисперсии и виды затухания: затухание и дисперсия, источником которой являются реологические эффекты, связанные с пузырьками (описываются величиной $\Delta\rho$ в (5)), вязкое трение при течении жидкости между стеблями и листьями (если жидкость и листья колеблются раздельно) и внутреннее трение между соприкасающимися стеблями и листьями. Два последних случая являются гипотезами и могут реализоваться, если слой водорослей очень густой.

Теория GS+ED+G многофункциональна и позволяет проверить существование всех трех компонент. Например, если положить в (3) $P = 1$ и в (5) $\gamma_p = 0$, $\phi = 0$, среда превращается в пузырьковую жидкость без твердой фазы. Если $\gamma_p > 0$, $n > 0$, то прибавляется трение между листьями, если $\phi > 0$, добавляется вязкое трение за счет относительного движения флюида внутри слоя водорослей.

Для случая водного слоя формулы (6) и далее упрощаются: $C_0 = 0$, $B_0 \ll A_0$, $B_{vis} = 0$, $B_{int} = 0$, $B_{el} = 0$, $B_{ac} = 0$. В таблице 1 приведены входные параметры, в таблице 2 – восстановленные параметры, на рисунке 1 – дисперсионные кривые.

Таблица 1. Входные параметры, использованные для расчета

K_f , Па	μ , Па·с	τ , Н/м	c_a , м/с	χ , м ² /с	M , кг/моль	γ	K_a , Па
1,9e9	1e-3	73e-3	315	2,4e-5	32e-3	1,41	1,45e5

Таблица 2. Инвертированные параметры. Вода и водоросли

R_0 , мм	γ_p , Па	n	S
0,095	100	0,87	0,007

Как видно из рисунка 1, расположение экспериментальных точек можно объяснить только специфической «пузырьковой» дисперсией и затуханием. Следует обратить внимание на график $\alpha_p(f)$. С ростом частоты затухание уменьшается несколько медленнее, чем у обычной резонансной кривой, что можно объяснить дополнительным трением между листьями водорослей. Трение будет все сильнее проявляться с увеличением частоты. Конечно, для подтверждения или опровержения этой гипотезы должны быть выполнены измерения и на больших частотах. В случае отсутствия трения, коэффициент трения $\gamma_p = 0$, в этом случае кривая $\alpha_p(f)$ с ростом частоты будет монотонно убывать.

Дисперсия и затухание звука в донном слое. Рассмотрим теперь более сложный и более интересный случай – дисперсия и затухание звука в донном слое без водорослей и с водорослями. Данные взяты из рисунка 2. Аналогичные приведенным на рисунке 3 дисперсионно-диссипативные кривые для глубины 5 см приведены на рис. 4, восстановленные характеристики осадков и пузырьков – в таблице 3.

Инверсия проводилась в три этапа. Сначала были восстановлены характеристики голых, без водорослей осадков (bare) – на рисунке 4 черная линия. Затем восстановлены характеристики осадков с растущими на них водорослями, предполагая, что пузырьков газа нет. На дисперсионные кривые, рассчитанные по этим характеристикам (тонкая зеленая линия) на третьем этапе были наложены резонансные особенности, возникающие за счет наличия пузырей газа (толстая зеленая линия). На рисунке 4 показана также линия $\sim f^1$ – у «правильных» морских осадков должна быть именно такая частотная зависимость затухания, что соответствует постоянному тангенсу потерь и постоянной добротности.

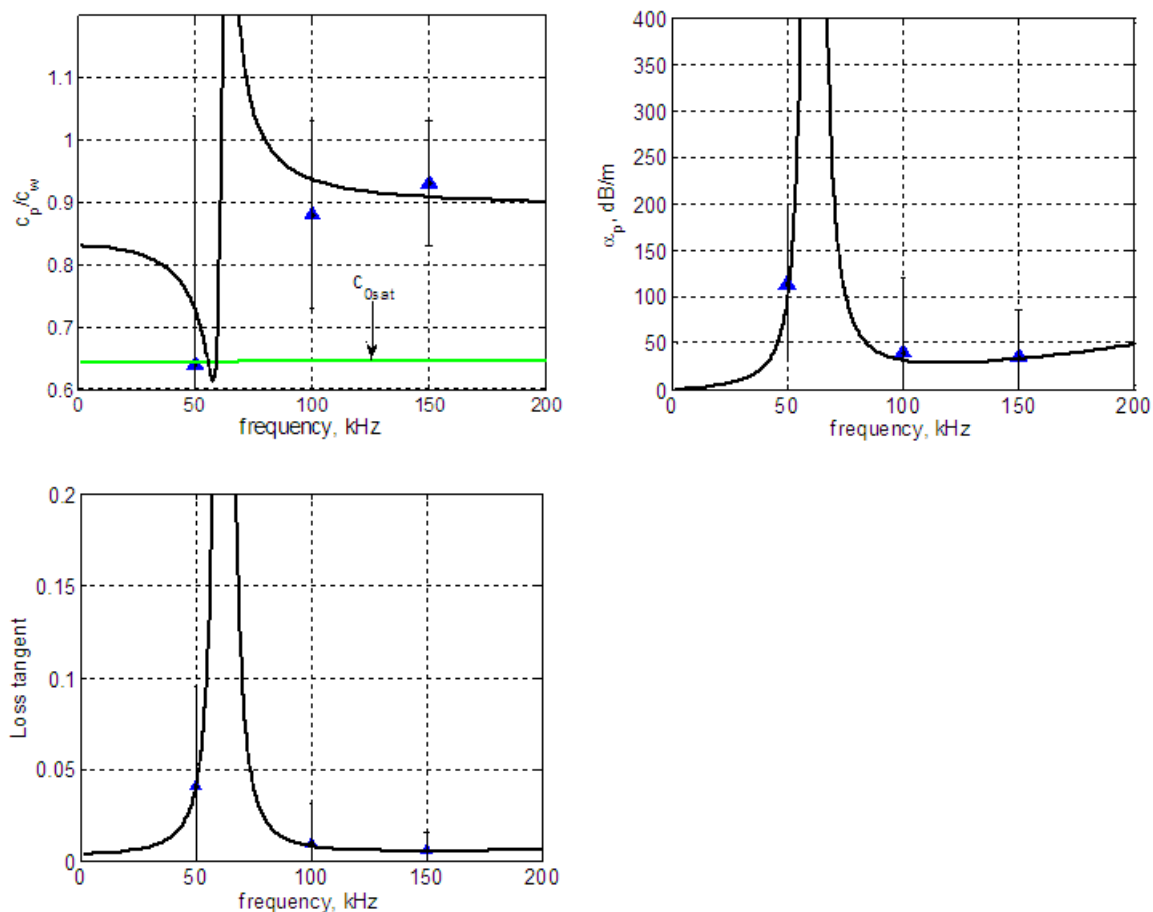


Рисунок 3. Дисперсионно-диссипативные кривые для слоя воды с водорослями. На верхней панели слева — бездисперсионное приближение. Для чистой воды $c_p/c_w = 1$

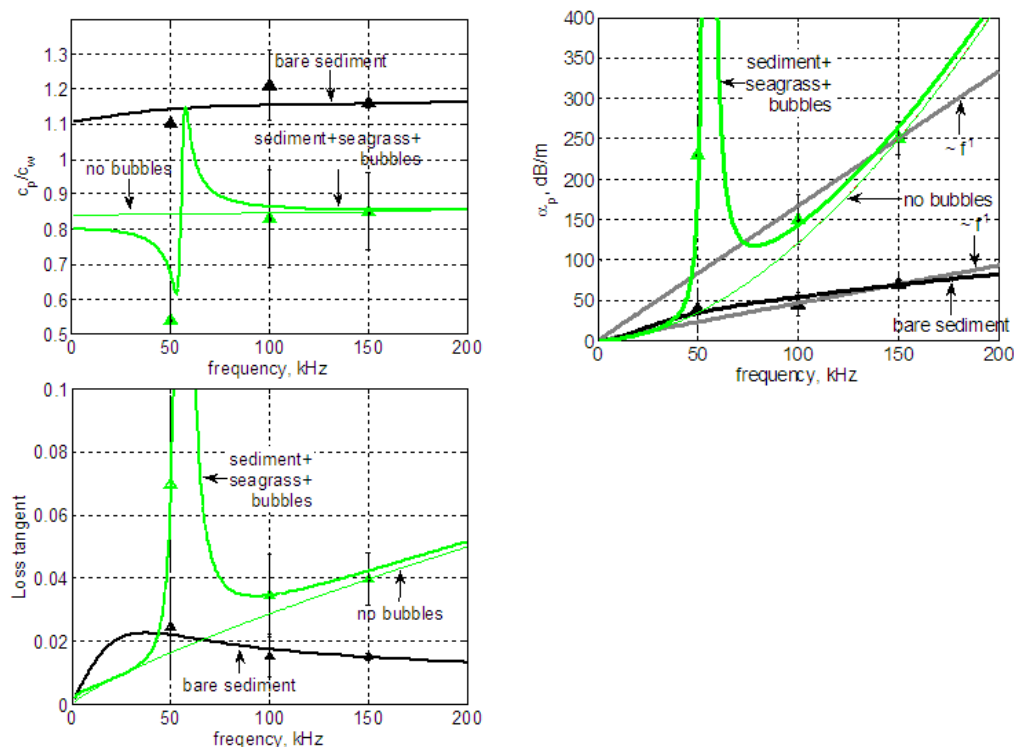


Рисунок 4. Дисперсионно-диссипативные кривые для слоя голых осадков и для слоя осадков с водорослями

Таблица 3. Инвертированные параметры. Осадки и водоросли, глубина 5 см

Параметр	R_0 , мм	S	G , Па	γ_p , Па	n	ϕ	P
голые осадки	0	0	н/о	$4,13e7$	0,055	0,22	0,38
осадки и водоросли	0	0	н/о	$2,8e3$	0,82	0	0,63
осадки, водоросли и пузырьки	0,08	0,005	$1e3$	$2,8e3$	0,82	0	0,63

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассмотрим вначале расположение экспериментальных точек, дисперсионные кривые и инвертированные параметры для случая голых осадков. Расположение экспериментальных точек не следует «правильному» закону $\alpha_p(f) \sim f^1$, характерному для плотных, слежавшихся, невозмущенных сред. Инверсия показывает очень низкий показатель стресс-релаксации (показатель нелинейности), что характерно для суспензионного состояния среды, где взаимодействие между частицами – упругое, линейное, в рамках закона Гука. Действительно, глубина водного слоя – 1 м, глубина в слое осадков – 5 см. Поверхностное волнение, течения, приливы возмущают осадки на такой малой глубине и переводят их во взвешенное, суспензионное состояние. Перколяционная пористость имеет значение 0,22, что хорошо совпадает с инверсиями, выполненными для песка аналогичного размера гранул в аналогичных гидродинамических условиях.

Осадки с корнями водорослей имеет значительно большую пористость, инверсия возвращает высокий показатель нелинейности (стресс-релаксации) и большую мягкость (меньшую жесткость) среды с биомассой. Перколяционная пористость равна нулю, что означает среду с непроницаемыми порами, забитыми органикой и пузырьками газа. Добавка газовой резонансной дисперсии немедленно исправляет явное расхождение между дисперсионно-диссипативными кривыми и экспериментальными точками.

Рассмотрим теперь водный слой с пологом водорослей (рис. 3). Сравнивая правую ветвь графиков $\alpha_p(f)$ и $\beta_p(f)$ на рисунке 3 и рисунке 4 – т.е. вода и пузырьки и твердая фаза, вода и пузырьки, сразу видно принципиальное отличие – в осадках правая ветвь восходящая, в воде – нисходящая. Это следствие межгранулярного трения. В воде поглощение – число резонансного характера, единственная физическая природа (это здесь мы предположили наличие трения между листьями), в осадках резонансное пузырьковое поглощение и межгранулярное трение. Сравнивая инвертированные радиусы и концентрации пузырьков, видно, что внутри осадков меньше и то и другое. Обратим внимание на существенную добавку сдвигового трения в осадках. Здесь мы положили наугад $G = 1 \cdot 10^3$ Па, так лишь, чтобы $G < \gamma_p$. Сдвиговое трение влияет и

на резонансную частоту пузырька и на добротность резонансной части диссипативной кривой. Возможно, принятое здесь значение завышено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении инверсий возникает проблема «уникальности» – является ли восстановленный набор параметров единственным. Судя по рис. 3, рис. 4, получено очень хорошее соответствие дисперсионных и диссипативных кривых с экспериментальными точками. Однако, это соответствие получено в рамках гипотезы о монодисперсной популяции пузырьков. Трудно представить себе ситуацию, в которой природа могла бы сгенерировать популяцию пузырьков с такими параметрами. Действительно, границы доверительного интервала, обозначенные на рис. 3 и рис. 4 позволяют сделать и альтернативные предположения, например, что пузырьки имеют в 2 – 3 раза большие размеры и функция распределения концентрации пузырьков по размерам достаточно широкая. В этом случае резонансная частота пузырьков сдвигается вниз, ниже 50 кГц, и экспериментальные точки $\alpha_p(f)$ оказываются на правом, спадающем участке частотной зависимости затухания, а точки $c_p(f)$ – на растянутом «переходном» участке дисперсионной кривой. Восстановление параметров среды для такой альтернативной гипотезы требует решения интеграла Y и наличия еще хотя бы одной экспериментальной точки на частотах ниже 50 кГц.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и города Севастополь в рамках научного проекта № 18-42-920001.

Список литературы / References:

1. Kevin M. L., Ballard M.S., McNeese A.R., Wilson P.S. Sound speed and attenuation measurements within a seagrass meadow from the water column into the seabed. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2017, vol. 141, no. 4, pp. EL402-EL406. DOI: 10.1121/1.4979302.
2. Kevin M.L., Ballard M.S., McNeese A.R., Wilson P.S. Sound speed and attenuation in seagrass from the water column into the seabed. *Proceedings of Meetings on Acoustics*, 2017, vol. 30, p. 005001. DOI: 10.1121/2.0000583.
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. 85-100. DOI: 10.22449/1573-160X-2019-1-77-91. (In Russ.)]
5. Mantouka A., Dogan H., White P.R., Leighton T.G. Modelling acoustic scattering, sound speed, and attenuation in gassy soft marine sediments. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2016, vol. 140, no. 1, pp. 274-282. DOI: 10.1121/1.4954753.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SEAGRASS AND VARIABILITY OF ACOUSTIC PROPERTIES OF THE BOTTOM LAYER OF THE SHALLOW SEA

Lastovenko O.R., Lisyutin V.A.

Sevastopol state university

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

Abstract. Biological processes associated with seagrass can greatly affect the spreading of sound speed in coastal areas where seagrass meadows are present. The acoustic effect is due to the production of gas bubbles by plants, which can affect the ability to detect objects and the possibility of bottom sonar mapping due to increased interference. We used the data of measurements of the sound velocity and attenuation coefficient in the bottom layer of water and with the bottom boundary layer, published in the scientific literature. In an environment with gas bubbles, the frequency dependences of the speed of sound and attenuation have a specific appearance. The dispersion equation of the GSED + g theory is given. Additional sources of dispersion and types of losses characteristic of gas-saturated media are considered and analyzed. In the framework of the GSED + g theory of the propagation of elastic waves in gas-saturated marine sediments, the physical properties of the gas-saturated bottom water layer and the bottom boundary layer are restored according to the measured frequency dependences of the speed of sound and the attenuation coefficient.

Key words: dispersion of sound speed, gassy saturated marine sediments, attenuation coefficient.

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ КСЕНОБИОТИКОВ В МАЛЫХ ДОЗАХ НА КЛЕТКАХ ДОНОРСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА

Морозова Г.И.¹, Козлова М.А.², Акшинцев А.А.²

¹ Российский университет дружбы народов

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

² Институт водных проблем РАН

ул. Губкина, 3, г. Москва, 119333, РФ; e-mail: mblshok@mail.ru

Поступила в редакцию: 29.07.2019

Аннотация. С целью оценки опасности для живых организмов вод, загрязнённых ксенобиотиками (КБ), исследовали влияние малых доз водорастворимых веществ: противоопухолевого циклофосфида (Ц), гормона дексаметазона (Д) и сульфата цинка (Zn) на сумму трансмембранных потенциалов на внешней и митохондриальной мембранах (ТМП) мононуклеарных (МН) клеток, выделенных из донорской крови, и на энергетическую активность популяций (ЭАП) клеток. Доза-зависимые эффекты в МН клетках оценивали по изменению интенсивности и цвета флуоресценции зонда-катиона 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) в митохондриях и ядрах клеток с помощью микрофлуориметра или на проточном цитометре. Экспериментально установлены пороговые дозы исследуемых веществ. Выявлена сравнительная безопасность Д в дозах (10^{-4} - 10^{-6}) мг/л, но в дозе $2 \cdot 10^{-3}$ мг/л обнаружен модулирующий эффект Д на показатель ЭАП. Установлено снижение ЭАП в активных МН клетках во всём диапазоне выбранных концентраций Ц. В сравнительных опытах с исходно низкими ТМП в МН клетках, обнаружен стимулирующий эффект малой дозы Ц (10^{-5} мг/л) на митохондрии некоторых клеток. В соответствие с электродиффузной теорией при длительном воздействии на организм малые дозы катионных лекарств могут быть токсичны для энергетического статуса иммунных клеток.

Ключевые слова: экологическая токсичность, дексаметазон, циклофосфамид, сульфат цинка, флуоресцентный зонд ДСМ, мононуклеарные клетки крови, энергетическая активность, митохондрии, трансмембранный потенциал.

Большинство химических соединений, используемых в человеческой жизнедеятельности, являются ксенобиотиками (КБ), т.е. веществами чуждыми организму [1-3]. Существенно, что на живые объекты одновременно могут воздействовать лекарственные вещества (ЛВ), примесные металлы и металлоиды окружающей водной среды, что может выражаться через синергические эффекты этих компонентов [1]. Проблема лекарственного и техногенного загрязнения водоёмов затрагивает не только аспекты обнаружения примесей в воде, но и оценку их опасности для гидробиоты и человека в микроконцентрациях.

Все аэробные клетки в норме содержат митохондрии, генерирующие протонный потенциал на мембранах [4]. Клеточные тесты с применением флуоресцентных зондов-ионов [5-8] основаны на принципе эпиморфизма между аэробными изолированными клетками и целостным организмом по отношению к ключевой общебиологической системе окислительного фосфорилирования, локализованной в митохондриях, и поэтому наиболее адекватны для выявления различных воздействий на энергетику живых организмов в целом. Прогнозирование эффектов действия малых доз водорастворимых ЛВ на клетки возможно в рамках электродиффузной модели распределения потенциал-чувствительного зонда-катиона 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) между цитоплазмой, митохондриями и ядром в живых лимфоцитах [3, 4]. Ранее установлено, что эффекты изменения интенсивности и цвета флуоресценции ДСМ в этих мембранных отсеках при воздействиях отражают изменение отрицательных трансмембранных потенциалов (ТМП) на плазматической, митохондриальной мембранах и положительного ТМП на ядерной мембране клеток [3, 5-10].

В ряде экспериментов показано, что гетерогенность клеток по энергетическому статусу можно представить в виде гистограмм распределения клеток по уровням ТМП, откалиброванных на основе результатов прямого измерения суммы ТМП в клетках с помощью ДСМ согласно методу [5]. При этом информативным и удобным индикатором энергетической активности популяции (ЭАП) клеток является отношение клеток в двух суммарных пулах гистограммы (с высокими и низкими значениями ТМП-ов) [7, 8]. В данной работе аналогичный методический подход использован для выявления токсического влияния малых доз некоторых водорастворимых веществ на энергетический статус мононуклеарных (МН) клеток, выделенных из донорской крови.

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью оценки экологической токсичности вод, загрязнённых ЛВ и тяжёлыми металлами, выбраны следующие водорастворимые вещества:

1) противоопухолевый препарат циклофосфамид (Ц) с цитостатическим, иммунодепрессивным действием [11]. Этот цитостатик был обнаружен в воде Иваньковского водохранилища, Канала им. Москвы и реки Истра в концентрациях 2-16 нг/л [1]. Иммунодепрессивное действие Ц проявляется в подавлении пролиферации лимфоцитарных клонов, участвующих в иммунном ответе [11, 12];

2) гормональный препарат глюкокортикоид дексаметазон (Д) с противовоспалительным, противоаллергическим, иммунодепрессивным действием [16]. Выбор этого вещества обусловлен его хорошей растворимостью в воде и повсеместным использованием. Гормон Д взаимодействует со специфическими цитоплазматическими рецепторами и образует комплекс, проникающий в ядро клетки; угнетает высвобождение цитокинов из лимфоцитов и макрофагов;

3) сульфат Цинка (Zn) при конечных его концентрациях в суспензиях клеток: 0,01 мг/л (Zn2); 0,001 мг/л (Zn3) и 0,0001 мг/л (Zn4) соответственно; установлено, что для зоопланктона токсичны 0,08 мг Zn/л и выше [1].

Используемые концентрации Ц или Д в суспензиях клеток из крови указаны в таблице 1.

Для тестирования проб воды, загрязненных малыми концентрациями выбранных ЛВ и Zn, использовали витальную тест-систему «Мононуклеарные клетки крови + ДСМ».

Исследования проводили на образцах суспензированных мононуклеарных (МН) клеток, выделенных из донорской венозной цитратной крови (10 доноров) (ФГУ РНЦ РР) по стандартной методике [13] путём центрифугирования образцов крови в градиенте плотности с последующим разбавлением полученных суспензий клеток культуральной средой в центрифужных пробирках до концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ кл/мл (для микрофлуориметрии) и до $0,6 \cdot 10^6$ кл/мл (для проточной цитометрии). Жизнеспособность клеток оценивали стандартным методом по окрашиванию клеток трипановым синим [13].

В экспериментах использовали микроскопа-микрофлуориметр Люмам И-2 с фотометрической насадкой ФЭУ (ЛОМО) и проточный цитометр (ПЦ) (Beckman Coulter Cytomics FC 500) с аргоновым лазером. Для исследования полученные клетки суспензировали в конусные пробирки (Eppendorf) объёмом 1,5 мл по 0,2 мл (для микроскопии) или по 0,7 мл (для ПЦ), в которые с интервалом 7 мин (для ПЦ) или 15 мин (для микроскопии) добавляли растворы выбранных веществ до конечных концентраций, указанных в таблице 1, или физиологический раствор в контрольные клетки в равных малых объёмах (1: 100). Пробирки с клетками после добавок последовательно инкубировали в термостате при 37°C с экспозицией 1 ч. В работе использовали потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний (ДСМ) [6, 8], синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии. Витальное флуорохромирование клеток осуществляли путем добавления физиологического раствора ДСМ к суспензии клеток до конечных его концентраций 2 мкМ (в опытах с Ц) или 0,2-1 мкМ (в опытах с Д) с последующим перемешиванием суспензии клеток и инкубацией их при 37°C с экспозицией 20 мин.

В экспериментах на микрофлуориметре нативные препараты клеток приготавливали методом раздавленной капли (на стекле) [4, 8], каждый препарат исследовали в течение 15 мин. Условия возбуждения, наблюдения и регистрации флуоресценции ДСМ в индивидуальных клетках аналогичны указанным в работах [4, 7, 8]. Распределение клеток по уровням суммы их ТМП на внешней и митохондриальной мембранах получали путём регистрации флуоресценции ДСМ в митохондриях этих клеток при разных концентрациях ДСМ аналогично [4, 10]. Для каждого образца исследовали по 100 клеток в контроле и опыте. В каждом опыте исследовали клетки из двух клеточных образцов каждого донора при одинаковых экспериментальных условиях и суммировали данные измерений для массива не менее 200 клеток. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [14].

Таблица 1. Концентрации циклофосфамида (Ц) и дексаметазона (Д), используемых в опытах

№	Обозначение концентраций циклофосфамида (Ц), дексаметазона (Д)	Конечные концентрации лекарств в суспензиях МН клеток, мг/л
1	Ц1 или Д2	0,2
2	Ц2 Д2	$2 \cdot 10^{-2}$
3	Ц3 Д3	$2 \cdot 10^{-3}$
4	Ц4 Д4	$2 \cdot 10^{-4}$
5	Ц5 Д5	$2 \cdot 10^{-5}$
6	Ц6 Д6	$2 \cdot 10^{-6}$

В экспериментах на ПЦ данные получали в виде гистограмм распределения клеток одновременно по интенсивностям трех типов флуоресценции зонда ДСМ в последовательные моменты времени после добавления ДСМ к суспензии клеток (с интервалом 7 мин). Возбуждение флуоресценции в протоке осуществляли длиной волны 488 нм излучения аргонного лазера, при этом разные спектральные области флуоресценции в клетках (зелёную - FL1 в мембранах, жёлтую - FL2 в митохондриях, красную - FL3 в ядрах) выделяли одновременно с помощью разных интерференционных фильтров с максимумами пропускания 525, 560 и 620 (нм) соответственно. В каждой гистограмме измеряли массив порядка 5000 клеток. В качестве показателей эффектов действия тестируемого лекарства на МН клетки использовали значения интенсивностей флуоресценции ДСМ в области пиков гистограмм (основных максимумов F1 для пула лимфоцитов и пула моноцитов) и количество (%) клеток в областях вблизи этих пиков в соответствии с методиками [15, 16]. На основе обобщения данных этих измерений строили график доза-зависимости эффектов действия лекарства на МН клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально установлено, что время достижения квазистационарного распределения катионов ДСМ в рабочих концентрациях между средой, цитоплазмой, митохондрием и ядром в МН клетках находится в пределах 15-30 мин. при 37 °С. Люминесцентная микроскопия показала, что в контрольных препаратах МН клеток с ДСМ (1-2 мкМ), распознаются активные лимфоциты и моноциты с жёлтой флуоресценцией митохондрий и слабой красной флуоресценцией в ядрах. В результате анализа клеток в препаратах по интенсивности и цвету флуоресценции ДСМ в их митохондриях и ядрах установлено, что массивы МН клеток, можно оптимально разделить на 4 пула. Эти пулы соответствуют откалиброванным диапазонам суммы ТМП ($\phi_{\text{п}} + \phi_{\text{мх}}$) на плазматической ($\phi_{\text{п}}$) и митохондриальной ($\phi_{\text{мх}}$) мембранах клеток согласно методикам в [4,7, 8]. Как отмечалось выше, для оценки изменения энергетического статуса клеток информативен показатель энергетической активности популяции клеток (ЭАП), заданный следующим образом:

$$\text{ЭАП} = N_3/N_{\text{сз}} = (n_3 + n_4) / (n_1 + n_2), \quad (1)$$

где n_i – число клеток в i -м пуле, N_3 и $N_{\text{сз}}$ – количество клеток в пулах с энергизированными (N_3) и слабо-энергизированными клетками ($N_{\text{сз}}$) соответственно. Изменение характера этой гетерогенности до и после воздействия отражает изменение суммарного ТМП, сопряжённого прежде всего с энергетикой митохондрий клеток данного пула. Сравнительные люминесцентно-микроскопические исследования и микрофлуориметрия МН клеток с ДСМ показали, что в диапазоне концентраций (Ц1- Ц4), как правило, уменьшается пул клеток с ярко-жёлтыми митохондриями и с высоким ТМП, а пул неярких клеток увеличивается. В последних снижается интенсивность флуоресценции ДСМ внутри митохондрий, а цвет изменяется от ярко-жёлтого до зелёного, появляется ярко-красная флуоресценция ДСМ в ядрах, утративших положительный ТМП на ядерной мембране [9].

Таблица 2. Распределение МН клеток крови по уровням их ТМП ($\Delta\phi$) в контрольных (К) и опытных (+..) образцах после их инкубации с разными концентрациями циклофосфида (Ц), сульфата цинка (Zn3) или дексаметазона (Д1)

$\Delta\phi = \Delta\phi_{\text{п}} + \Delta\phi_{\text{мх}}$ mV	<60	60 – 150	160 – 220	230 – 280	ЭАП
n	1	2	3	4	$(n_3 + n_4)/(n_1 + n_2)$
К, % клеток	2 ± 1	18 ± 2	45 ± 4	35 ± 3	4.1 ± 0.5
+Ц1	6	24	44	26	2.3
+Ц2	6	32	45	17	1.6 ↓
+Ц3	9	25	43	23	1.9
+Ц4	4	27	42	27	2.2
+Ц5	3	19	49	29	3.5
+Ц6	4	24	53	19	2.5
+Zn3	2	40↑	54	4↓	1.4↓
+(Zn3 + Ц2)	10↑	38↑	45	7↓	1.1↓
+Д1	1	19	42	38 ↑	4.0

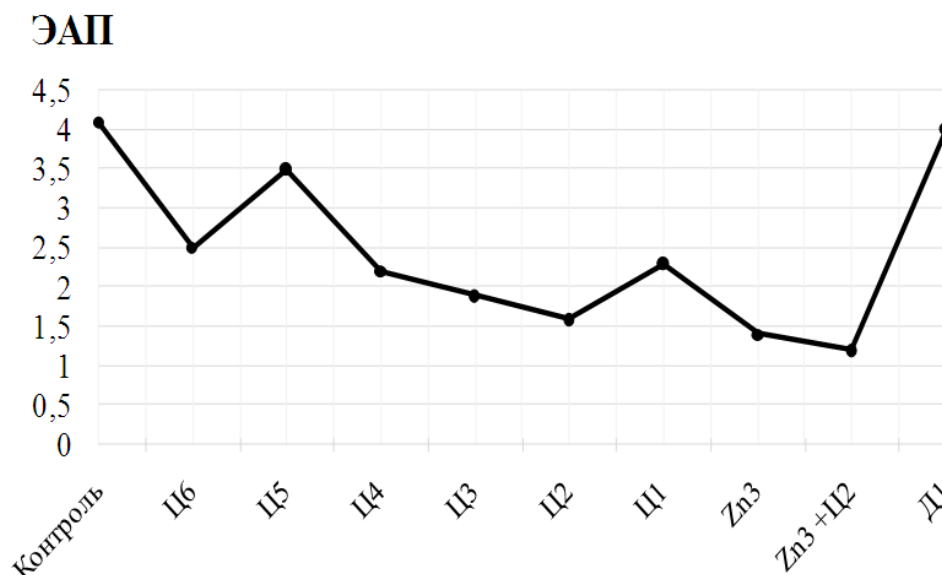


Рисунок 1 Доза-зависимость эффектов циклофосфамида (Ц) в МН клетках по индексу энергетической активности популяции клеток (ЭАП). Погрешность: $\pm 0,5$

Среднестатистические данные влияния циклофосфамида (Ц) в диапазоне концентраций Ц1 – Ц6, а также Zn3 или дексаметазона (Д1) на показатель ЭАП МН клеток представлены и в таблице 2 и на рисунке 1. Наибольший эффект достигается при дозах Ц, близких к физиологическим (Ц1, Ц2), а также после инкубации клеток с Zn3; при совместном действии Zn3 и Ц2 выявляется синэргическое усиление этого эффекта. В то же время в экспериментах обнаружена заметная тенденция к стимуляции части клеток в опыте с дозой Ц5. Эта особенность отражается в нелинейном характере доза-зависимости эффектов Ц в МН клетках по показателю ЭАП.

С целью обнаружения взаимосвязи между исходным состоянием клеток по ЭАП и характером их реакции на цитостатик Ц, исследовали его эффекты на МН клетки из суспензий, которые предварительно выдерживали сутки при температуре 20°C. Результаты этих опытов представлены в таблице 3. Показатель ЭАП в контроле суточных клеток (МНс) оказался в 1,5 ниже по сравнению с контрольными свежими клетками при тех же условиях инкубации. Важно отметить, что в опытах на МНс, где много клеток с низкими ТМП, обнаружен эффект стимуляции ЭАП малыми дозами Ц, достоверный для дозы Ц5. При этом во всех контролях жизнеспособность свежих и суточных клеток (по тесту с трипановым синим) изменяется незначительно (на 3-5 %).

Сопоставление полученных данных указывает, в основном, на односторонний характер действия Ц в свежих и суточных клетках, отражающий снижение доли (%) клеток с более высокими ТМП за исключением эффекта дозы Ц5. В последнем случае частичная дезэнергизация наиболее активных митохондрий, накопивших катионы Ц, возможно, способствует активации «спящих митохондрий», для повреждения которых уже недостаточно микроконцентрации Ц5 [14].

Из представленных выше данных следует, что гормон даже в наибольшей дозе Д1 не оказывает достоверного влияния на МН клетки. Поэтому для выявления возможного действия малых доз Д на энергетику МН клеток использовали метод проточной флуориметрии, более чувствительный и позволяющий измерить в каждом опыте большой массив клеток.

Таблица 3. Влияние циклофосфамида (Ц) на ТМП ($\Delta\phi$) и ЭАП суточных клеток (МНс)

$\Delta\phi = \Delta\phi_{\text{п}} + \Delta\phi_{\text{мх}}$ mV	< 60	60 -150	160 - 220	230 - 280	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
Контроль, % МНс	5 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	55 $\pm$ 4	21 $\pm$ 3	2,8 $\pm$ 0,4
+ Ц3	8	25	44	23	2,0 ↓
+ Ц4	6	24	46	24	2,3
+ Ц5	3	20↓	53	24	3,3 ↑

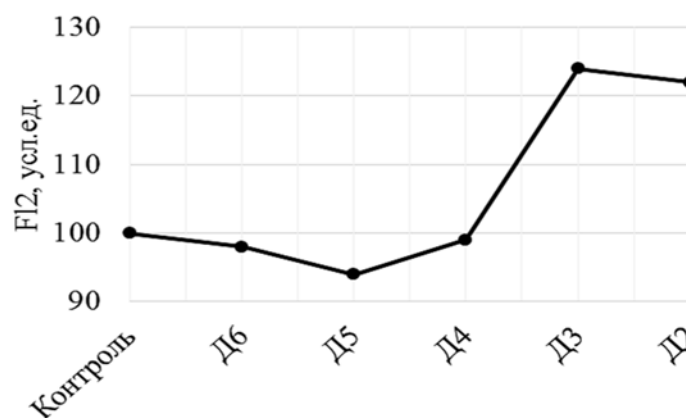


Рисунок 2. Обобщенные данные флуориметрии МН клеток из крови в протоке: нормированные значения (по линейной шкале) положений пика для гистограмм распределения клеток по интенсивности жёлтой (560 нм) флуоресценции (F12) зонда ДСМ (0,5мкМ) до (контроль) и после прединкубации клеток с гормоном дексаметазоном (Д) в дозах, указанных по оси абсцисс (обозначения согласно таблице 1). Погрешность измерений: $\pm 2\%$

На рисунке 2 представлен обобщённый результат анализа эффектов разных доз Д в МН клетках, полученных на проточном цитометре. Эффекты малых доз Д на энергетику клеток здесь выявляли по изменению количества клеток на уровне медианной линии в области пиков гистограмм распределения клеток по интенсивности митохондриальной (560 нм) флуоресценции ДСМ (F12). Полученные данные свидетельствуют о весьма слабом эффекте снижения ТМП в клетках в присутствии малых доз гормона (Д5-Д4). Но в дозах Д2, Д3 гормон вызывает достоверный роста F12 в некотором пуле МН клеток. Из сопоставления полученных данных можно предполагать, что эффекты малых доз Д зависят от исходного состояния иммунных клеток крови. Гормон в дозе Д5, по-видимому, может снижать ТМП в пуле наиболее активных клеток, связываясь с внешней мембраной и вызывая через рецепторную сигнализацию изменения в соотношении внутриклеточных регуляторов метаболизма [11]. Таким образом может проявляться его иммунодепрессивное действие на исходно гиперактивные лимфоциты и моноциты. Обнаруженные разнонаправленные эффекты влияния Д на ТМП в МН клетках указывают на возможное модулирующее действие малых доз Д в отношении активности иммунных клеток. Подобное неспецифическое модулирующее действие на митохондрии наблюдался в опытах с гидрофильным гормоном эритропоэтином в лимфоцитах [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из анализа полученных результатов и на основании электродиффузной теории [17], можно заключить, что длительное употребление человеком водных растворов, содержащих микроконцентрации катион-образующих цитостатиков в сочетании с ионами тяжёлых металлов, опасно для энергетики МН клеток крови. В результате этих воздействий могут повреждаться митохондрии, а катионные молекулы Ц будут накапливаться в ядрах клеток, связываясь с ДНК, и оказывая торможение на пролиферативную активность клеток. В итоге возможно пролонгированное негативное влияние Ц на клеточный иммунитет, что согласуется с экспериментальными данными других исследователей о наличии побочного эффекта при длительном воздействии цитостатиков на организм [12]. Таким образом, в свете проблемы экологической безопасности загрязнение водных ресурсов даже микроконцентрациями катионных цитостатиков и других КБ может быть токсично для клеток крови и иммунной системы человека в целом. В принципе высока опасность повреждения такими веществами и других клеточных тканей с исходно высокими ТМП, например, клеток эпителия почек, эмбриональных клеток. При очень длительном употреблении воды, загрязнённой микроконцентрациями дексаметазона, нельзя исключить развитие иммунодепрессии вследствие постепенного снижения энергетики митохондрий и специфического угнетения этим гормоном синтеза цитокинов в иммунных клетках [18].

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-17-00672).

Список литературы / References:

1. Barenboim G.M., Kozlova M.A. Pollution of Sources of Drinking Water Supply of Large Cities with Pharmaceuticals (the Example of Moscow, Russia). *Water Resources*, 2018, vol. 45, no. 6, pp. 925-936.
2. Santos L., Araujo A., Fachini A. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, vol. 175(1-3), pp. 45-95.
3. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989, 277 с. [Dobretsov G. E. *Fluorescent probes in the study of cells, membranes and lipoproteins*. М.: Science, 1989, 277 p. (In Russ.)]
4. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V.P. *Energy of biological membranes*. М.: Science, 1989, 123 p. (In Russ.)]

5. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда-катиона ДСМ на цитоплазматической и митохондриальной мембранах. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273. [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu.A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe-cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266-273. (In Russ.)]
6. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И. Г., Коробкова Е. Н., Полосина О. В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, с. 43-47. [Morozova G.I., Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Baziyeva F.H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematol. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, pp. 43-47. (In Russ.)]
7. Морозова Г.И., Корнилаева Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич Т.М., Боженко В.К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластоидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2014, № 11, с. 31-38. [Morozova G.I., Kornilaeva G.V., Podchernyaeva R.Ya., Kulenich T.M., Bozhenko V.K. Study of influence millimeter-wave EHF-irradiation on membrane structures of the T-lymphoblastoid cells culture using a fluorescent probe-cation DSM. *Biomedicine Radioengineering*, 2014, no. 11, pp. 31-38. (In Russ.)]
8. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating effect of erythropoietin on thy timocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. *Biochem. Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.
9. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. *Сборник докладов 2-го съезда биофизиков России*, 1999, с. 256-257. [Morozova G. I., Poletaev A.I., Borschevskaya T.A. Inverted electrochemical potential on the nuclear membrane of cells and its relationship with cellular energy. *Reports of the 2nd Russia biophysicists Congress*, 1999, pp. 256-257. (In Russ.)]
10. Toshakov V.G., Morozova G.I., Onishchenko N.A. Energy metabolism of cryoprevved rad hehatocytes. *Cryo-letters*, 1991, no. 12, pp. 259-272
11. Долматова Л.С., Уланова О.А., Долматов И.Ю. Сравнительное исследование действия дексаметазона и нового экстракта из голотурий на уровень цитокиноподобных веществ в отдельных типах иммуноцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix*. *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2014, № 1, с. 34-38. [Dolmatova L.S., Ivanov O.A., Dolmatov I.Yu. A comparative study of the dexamethasone and a new extract from holothuria effect on the level of cytokine-like substances in certain types of immunocytes of holothuria *Eupentacta fraudatrix*. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*, 2014, no.1, pp. 34 -38. (In Russ.)]
12. Телегин Л.Ю. *Фармакогенетика циклофосфамида*. М.: НИЦ ИНФРА-М, 2017, 78 с. [Telegin L.Yu. *Pharmacogenetics of cyclophosphamide*. М.: Research Center INFRA-M, 2017, 78 p. (In Russ.)]
13. Ковальчук Л.В. [и др.] *Иммунология: практикум: учебное пособие*. ГЭОТАР-Медиа, 2010, 176 с. [Kovalchuk L. V. [et al.] *Immunology: practicum: textbook*. GEOTAR-Media: 2010, 176 p. (In Russ.)]
14. Бейли И.Н. *Статистические методы в биологии*. М.: Наука, 1963, 277 с. [Bailey I.N. *Statistical methods in biology*. М.: Science, 1963, 277 p. (In Russ.)]
15. Rink T.J., Montcuoco C., Hesketh T.R., Tsien R.V. Lumphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochim. and biophys. Acta*, 1980, vol. 595, no.1, pp. 15-30.
16. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. *Проточная цитометрия как современный анализа в биологии и медицине*, 2007, т. 9, № 5, с. 373-378 [Khaydukov S.V., Zurotchka A.V. *Flow cytometry as a modern analysis in biology and medicine*, 2007, vol. 9, no. 5, pp. 373-378. (In Russ.)]
17. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. *Физические механизмы функционирования биологических мембран*. М.: МГУ, 1987, 187 с. [Tverdislov V.A., Tikhonov A.N., Yakovenko L.V. *Physical mechanisms of biological membranes functioning*. М.: Moscow State University, 1987, 187 p. (In Russ.)]
18. Забродский П.Ф., Теректук Т.С., Плахута И.А., Серов В.В. Особенности фармакологической регуляции нарушений иммунного ответа, обусловленных применением циклофосфамида. *Вестник Волгоградского ГМУ*, т. 21, № 1, с. 39-41. [Zabrodskii P.F., Terentyuk T.S., Plakhuta I.A., Serov V.V. Peculiarities of pharmacological regulation of the immune response violations resulting from the application of cyclophosphamide. *Vestnik of Volgograd GMU*, vol. 21, no.1, pp. 39-41. (In Russ.)]

EVALUATION OF THE ENVIRONMENTAL TOXICITY OF AQUEOUS SOLUTIONS
WITH LOW XENOBIOTICS DOSES ON BLOOD DONOR CELLS USING A POTENTIAL-SENSITIVE
FLUORESCENT PROBE

Morozova G.I.¹ Kozlova M.A.², Akshintsev A.A.²

¹ Russian Peoples' Friendship University

st. Miklukho-Maklay, 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: gimorozova@mail.ru

² Water Problems Institute of RAS

st. Gubkina, 3, Moscow, 19991, Russia; e-mail: mblshok@mail.ru

Abstract. In order to evaluate the danger of waters contaminated with xenobiotics for the living organisms, the effect of low doses of water-soluble substances was investigated. In particular, we used the following substances: antitumor drug Cyclophosphamide (C), hormone Dexamethasone (D), and Zinc sulfate (Zn). All they acted on the total transmembrane potential of the plasma and mitochondrial membranes (TMP) and on energy activity of the population (EAP) of mononuclear (MN) cells isolated from donor blood. Dose-dependent effects of substances were evaluated by the changes in the fluorescence intensity and color of cationic probe 4-(n-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium(DSM) in the cell mitochondria and nuclei using microfluorometer and flow cytometer. Experimentally threshold doses of test substances were established. A relative safety of small D doses (10^{-4} - 10^{-6} mg/l) was revealed. But at the dose $2 \cdot 10^{-3}$ mg /l a modulating D-effect concerning the indicator of EAP was found. Some decrease in EAP of the active MN cells was detected in almost whole range of C concentrations. However, in comparative experiments on MN with low TMP levels, the mitochondria stimulating C-effect ($2 \cdot 10^{-5}$ mg/l) was found. The presence of Zn and C (10^{-3} mg/l) in cell suspensions decrease in TMP and EAP. According to electrodiffusion theory, with long-term exposure to the body, small doses of cationic drugs can be toxic to the energy status of immune cells.

Key words: *environmental toxicity, dexamethasone, cyclophosphamide, zinc sulfate, fluorescent probe DSM, mononuclear blood cells, energy activity, mitochondria, transmembrane potential.*

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ ПЕРИФИТОНА СИСТЕМ ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ

Дорошенко Ю.В.

ФГБУН ФИЦ «Институт южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: julia_doroshenko@mail.ru
Поступила в редакцию: 29.07.2019

Аннотация. В работе приведён сравнительный анализ некоторых характеристик роста бактериальных и дрожжевых культур, выделенных из перифитона систем гидробиологической очистки морских вод. Исследование микроорганизмов в этом аспекте представляет интерес для выявления их роли в процессах самоочищения и трансформации загрязняющих веществ. В эксперименте использовали чистые культуры представителей массовых родов бактерий и дрожжей перифитона. Установлено, что средняя скорость прироста биомассы для всех бактериальных культур была максимальной через 50 ч эксперимента (0,98-1,28 %/ч), а затем снижалась до (0,35-0,46 %/ч). Скорость прироста биомассы дрожжей также максимальна в первые 50 ч (1,62-1,72 %/ч), к концу эксперимента составляла (0,55-0,58 %/ч). Изучение кинетики роста морских дрожжей *Candida* показало, что их скорость роста выше, чем у бактерий. Значения прироста биомассы у дрожжей с течением времени возрастали. Количественно подтверждено, что окрашенные формы дрожжевых организмов размножаются менее интенсивно и это может влиять на частоту их встречаемости. Полученные результаты могут быть использованы для расчётов самоочищающей способности акваторий, в которых расположены или будут расположены системы гидробиологической очистки морских вод. При работе над активными ассоциациями микроорганизмов-деструкторов загрязняющих веществ, так же необходимо учитывать скорость и характер их роста.

Ключевые слова: кинетические характеристики роста, морские дрожжи, бактерии, системы гидробиологической очистки, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Возможность целенаправленного использования морских организмов для очистки морской воды и оздоровления прибрежных акваторий была сформулирована О.Г. Мироновым ещё в 1969 г. [1]. Последующие многолетние исследования заложили теоретическую базу разработки систем гидробиологической очистки (СГО), в основе которых лежат естественные процессы самоочищения морской среды [2, 3].

Под системой гидробиологической очистки понимается сформированное на искусственных субстратах, размещённых в толще воды, сообщество гидробионтов, характерное для данного района моря и способствующее улучшению экологического состояния морской акватории [2].

Наиболее обстоятельно развитие микрообрастания в Чёрном море было изучено Ю.А. Горбенко [4]. Им установлена следующая последовательность колонизации искусственных субстратов: бактерии → дрожжи → гетеротрофные жгутиконосцы, почти одновременно с ними – диатомовые водоросли и инфузории. В других морях сукцессии микрообрастания изучены менее подробно. Однако общий порядок оседания микроорганизмов из планктона оказывается близким к указанному.

Установлены общие процессы, которые лежат в основе биообрастания естественных и искусственных твердых поверхностей любыми организмами: микроорганизмами, беспозвоночными животными, а также макроводорослями. К ним относятся миграции (активные и пассивные), оседание и прикрепление расселительных форм, развитие и рост осевших на поверхность особей [5]. Эти процессы последовательно сменяют друг друга при развитии микро- и макрообрастания; следовательно, морское обрастание содержит практически все группы сидячих организмов, как животных, так и растений. Кроме того, в зарослях, образуемых сидячими формами, всегда встречаются и подвижные животные, но они никогда не являются руководящими. В обрастании всегда присутствуют бактерии, которые первыми появляются на чистой поверхности, помещённой в воду. Для развития обрастания первичная плёнка, состоящая из бактерий и микроскопических водорослей, играет большую роль, так как способствует или препятствует поселению многих более крупных обростателей [6], на поверхности которых, в свою очередь, развиваются микроорганизмы.

При влиянии различных экологических факторов, как антропогенных, так и биотических, происходят явные отклонения от общей схемы формирования перифитона [7].

Регулярные наблюдения за развитием и функционированием сообщества обрастания СГО убедительно доказывают целесообразность их использования в зонах экологического риска. Была определена численность бактерий перифитона СГО [3]. Однако для выявления роли микроорганизмов перифитона (бактерий и дрожжей) в процессах самоочищения и трансформации загрязняющих веществ необходимо иметь представление о скорости и характере их роста.

Цель работы - изучить кинетические характеристики бактерий и дрожжей перифитона СГО с помощью автоматического анализатора «BioScreen C».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Система анализа кривых роста «BioScreen C» напрямую измеряет рост микроорганизмов. По мере роста микроорганизмов они увеличивают мутность среды. Измеряя мутность этой среды во времени, можно получить кривую оптической плотности. Кривая отражает рост (увеличение концентрации) интересующего организма. Для работы на автоматическом анализаторе «BioScreen C» с программой BIORN использовали чистые культуры бактерий и дрожжей, выделенные из перифитона СГО (СГО-1, СГО-2) [8, 9]. За сутки до постановки эксперимента культуры пересевались. Затем из пробирки капилляром закапывали пересевленную культуру в ячейки плашки в пяти повторностях; объем каждой ячейки составлял 0,02 мл. Прибор использовался нами как индикаторный, т.е. максимальная величина оптической плотности принималась за 100 % и относительно неё рассчитывались остальные параметры роста.

Для каждой культуры определяли следующие параметры: относительную максимальную плотность (биомассу) культуры ($B_{\max. \text{отн.}}, \%$); относительный прирост ($\Delta B_{\max. \text{отн.}}, \%$); среднюю скорость прироста ($V_{cp} = \Delta B_{\max. \text{отн.}} / \Delta t$).

Длительность эксперимента составляла 150 ч, а данные абсорбции снимали каждые 50 ч. В эксперименте использовали представителей массовых родов бактерий (*Marinococcus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*) и дрожжей (*Candida*, *Rhodotorula*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из участков Севастопольской бухты, подверженным антропогенному воздействию, является акватория Нефтегавани, расположенная в глубине бухты и функционирующая с 1903 г. [2]. В 90-х годах прошлого столетия в Нефтегавани были размещены два варианта систем гидробиологической очистки морской воды. Первая система (СГО-1) представляет собой капроновую сеть (дель рыболовецкого трала), закреплённую на подводной части свай (глубина 0-2 м) нефтеналивного пирса. Ячейка сети составляет 5×5 см, протяжённость 4 м. Вторая система (СГО-2) сконструирована на основе секций сетевого заграждения, подводная часть которой состоит из стальных колец диаметром 25 см и располагается от поверхности моря до дна (глубина 5-6 м), общая протяжённость системы 50 м.

К началу нашего исследования на системах уже сформировалось и функционировало сообщество обрастания, состоящее преимущественно из мидий, характерное для Севастопольской бухты. Несмотря на выполненную другими исследователями [2, 3] оценку фильтрационной активности систем, а также бентосных сообществ в районе их размещения, детальное изучение микрофлоры перифитона этих систем не проводилось.

Автоматический анализатор «Bioscreen C» позволяет более детально изучать особенности физиологии микроорганизмов, в частности, характер роста культур бактерий и дрожжей. Приведём сравнительный анализ кинетических характеристик их роста. Относительная максимальная биомасса (плотность) отмечена через 100 ч у культуры, принадлежащей к роду *Vibrio*. В первые 50 ч эксперимента максимальная плотность также наблюдалась для рода *Vibrio* и составляла 79,4 %, а минимальная – для *Pseudomonas* (рис. 1). Через 150 ч

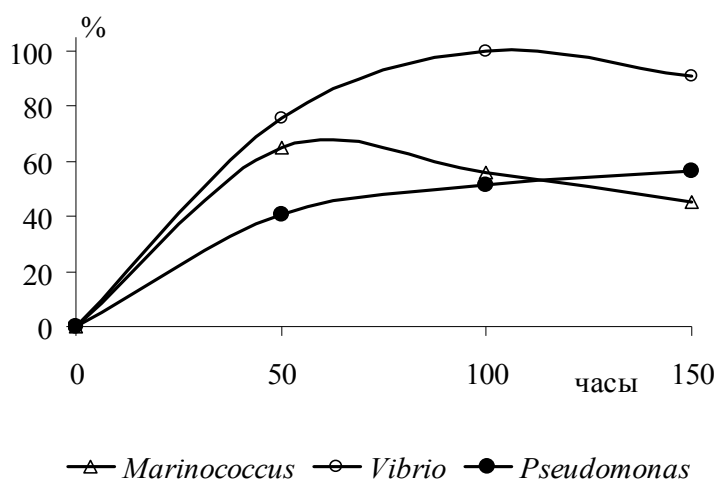


Рисунок 1. Рост относительной биомассы бактерий перифитона в эксперименте

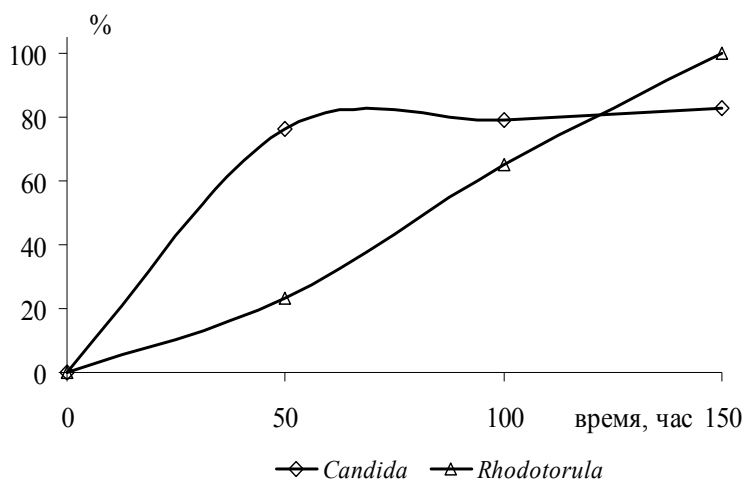


Рисунок 2. Рост относительной биомассы дрожжей перифитона в эксперименте

Таблица 1. Ростовые характеристики исследуемых культур бактерий и дрожжей

Культура	Относительный прирост биомассы $\Delta B_{\text{мах. отн.}}, \%$			Средняя скорость прироста $V_{\text{ср. отн.}} = \Delta B_{\text{мах. отн.}} / \Delta t$		
	через 50 ч	через 100 ч	через 150 ч	через 50 ч	через 100 ч	через 150 ч
<i>Marinococcus</i>	60,1	56,3	51,9	1,20	0,56	0,35
<i>Vibrio</i>	64,2	70,5	68,6	1,28	0,71	0,46
<i>Pseudomonas</i>	49,1	55,4	57,7	0,98	0,55	0,38
<i>Candida</i>	83,2	83,8	84,5	1,7	0,8	0,6
<i>Rhodotorula</i>	43,1	79,6	86,7	0,9	0,8	0,6

эксперимента максимальная плотность была у представителя рода *Vibrio* – 91,1 %. Следует отметить, что у бактерий рода *Pseudomonas* выявлена тенденция к увеличению плотности культуры со временем, в отличие от других культур, где после 150 ч культивирования у бактерий наблюдали замедление роста. Такой рост биомассы ранее был отмечен только для дрожжевых культур [8].

Для дрожжевых культур максимальное значение плотности отмечено через 150 ч эксперимента у *Rhodotorula*. Однако в первые двое суток рост относительной биомассы составил только 23,4 % (рис. 2).

Первые работы по изучению морских дрожжей показали, что их скорость роста выше, чем у бактерий [8].

Относительный прирост биомассы для *Vibrio* составил от 64 до 70 %, причём максимум отмечен через 100 ч. Для рода *Marinococcus* максимальные значения зафиксированы уже через 50 ч, а к концу эксперимента они постепенно снижались. Однако прирост биомассы для *Pseudomonas* возрастал с 49,1 до 57,7 % (табл. 1).

Установлено, что средняя скорость прироста биомассы для всех бактериальных культур была максимальной через 50 ч эксперимента (0,98-1,28 %/ч), а затем она постепенно снижалась (0,35-0,46 %/ч). Скорость прироста биомассы дрожжей также максимальна в первые 50 ч (1,62-1,72 %/ч), и уменьшается до 0,55-0,58 %/ч.

Значения прироста биомассы у дрожжей с течением времени возрастали, даже на седьмые сутки. Тогда как для бактерий подобное явление отмечено только для представителя рода *Pseudomonas*. При этом средняя скорость прироста была в два раза ниже к концу эксперимента. Полученные результаты для *Candida* были идентичны определённым ранее для ряда дрожжевых культур [8]. Исключение составляет *Rhodotorula*, что согласуется с литературными данными. Ранее [10] выявлено, что окрашенные формы дрожжевых организмов размножались менее интенсивно. Следовательно, скорость роста отдельных видов дрожжей может влиять на частоту их встречаемости.

Полученные результаты могут быть использованы для расчётов самоочищающей способности акваторий, в которых расположены или будут расположены системы гидробиологической очистки морских вод. При работе над активными ассоциациями микроорганизмов-деструкторов загрязняющих веществ в водных бассейнах, так же необходимо учитывать скорость и характер их роста.

ВЫВОДЫ

Максимальная относительная плотность культуры бактерий отмечена для рода *Vibrio*, который является доминирующим в перифитоне СГО. Скорость прироста для всех бактерий максимальна в первые 50 ч (0,98-1,28 %/ч), а затем постепенно снижается (0,35-0,46 %/ч).

Скорость прироста биомассы дрожжей также максимальна через двое суток (1,62-1,72 %/ч), и уменьшается до 0,55-0,58 %/ч к концу эксперимента на седьмые сутки. Прирост биомассы у дрожжей, в отличие от большинства бактерий, с течением времени возрастает.

Количественно подтверждено, что окрашенные формы дрожжевых организмов размножаются менее интенсивно и это может влиять на частоту их встречаемости.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме ФИЦ ИнБЮМ № АААА-А18-118020890090-2.

Список литературы / References:

1. Миронов О.Г. К вопросу о самоочищении морской воды от нефтепродуктов. *Гидробиологический журнал*, 1969, т. 5, № 4, с. 89-93. [Mironov O.G. On the issue of self-cleaning of sea water from oil product. *Hydrobiological journal*, 1969, vol. 5, no. 4, pp. 89-93 (In Russ.)]
2. Mironov O.G., Schekaturina T.L., Alyomov S.V. Perspectives of using of marine polluted water cleaning hydrobiological method for sanitation and improvement of the coastal aquatoria state. *Oil spills in the Mediterranean and Black Sea regions: 2-nd Intern. Conf.*, 31st Oct.-3rd Nov. 2000, Istanbul, 2000, pp. 187-195.
3. Миронова О.Г., Алёмова С.В. *Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века*. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018, 276 с. [Mironov O.G., Alyomov S.V. *Sanitary and biological studies of the south-western Crimea coastal waters at the beginning of XXI century*. Simferopol: PP «ARIAL», 2018, 276 p. (In Russ.)] DOI:10.21072/978-5-907118-89-8.
4. Горбенко Ю.А. *Ecology and practical importance of marine microorganisms*. К.: Наук. думка, 1990, 160 с. [Gorbenko Yu.A. *Analysis of dosage forms. Practical Guide*. L.: Nauk. dumka, 1990, 160 p. (In Russ.)]
5. Раилкин А.И. *Процессы колонизации и защита от биообрастания*. СПб: Изд-во С.-Петербург. Ун-та, 1998, 272 с. [Raikina A.I. *The process of colonization and protection from biofouling*. SPb.: Izd-vo S-Peterburg. Un-ta, 1998, 272 p. (In Russ.)]
6. Зевина Г.Б. *Биология морского обрастания*. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1994, 135 с. [Zevina G.B. *Biology of marine fouling*. M.: Izd-vo Mosk. Un-ta, 1994, 135 p. (In Russ.)]
7. Маврин А.С., Быкова С.Н., Виноградов Г.А., Жуков Б.Ф. Структурно-функциональные преобразования микроперифитонных сообществ под влиянием биотических факторов. *Биол. внутр. вод*, 2001, № 4, с. 58-65. [Mavrin A.S., Bukova S.N., Vinogradov G.A., Zhukov B.F. Structural and functional transformations of microperiphytic communities under the influence of biotic factors. *Inland water biology*, 2001, no. 4, pp. 58-65 (In Russ.)]
8. Дорошенко Ю.В. Исследование ростовых характеристик бактериальных и дрожжевых культур перифитона систем гидробиологической очистки морских вод. *Экология моря*, 2008, вып. 76, с. 49-53. [Doroshenko Yu.V. Investigation of the growth characteristics of bacteria and yeasts of periphyton of systems of hydrobiological cleaning of marine waters. *Marine ecology*, 2008, iss. 76, pp. 49-53 (In Russ.)]
9. Дорошенко Ю.В. Морские дрожжи в сообществе обрастаний систем гидробиологической очистки. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 2014, вып. 11, с. 219-222. [Doroshenko Yu.V. Marine yeasts in the fouling communities of systems of hydrobiological cleaning. *Ecosystems, their optimization and protection*, 2014, iss. 11, pp. 219-222 (In Russ.)]
10. Новожилова М.И. *Аспорогенные дрожжи и их роль в водоемах*. Алма-Ата: Наука, 1979, 200 с. [Novozhilova M.I. *Asporogenic yeasts and its role in water reservoir*. Alma-Ata: Nauka, 1979, 200 p. (In Russ.)]

THE KINETIC GROWTH CHARACTERISTICS OF MICROORGANISMS OF PERIPHYTHON OF THE HYDROBIOLOGICAL CLEANING SYSTEMS

Doroshenko Yu.V.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia, e-mail: julia_doroshenko@mail.ru

Abstract. The comparative analysis of some growth characteristics of the periphyton bacterial and yeast cultures of hydrobiological cleaning systems of sea water is given. The study of microorganisms in this aspect is of interest to identify their role in the processes of self-purification and transformation of pollutants. Pure cultures of representatives of mass genera of bacteria and periphyton yeasts were used in the experiment. It was found that the average biomass growth rate for all bacterial cultures was maximum after 50 hours of the experiment (0.98-1.28 % / h), and then decreased to 0.35-0.46 % / h. The yeast biomass growth rate is also maximum in the first 50 hours (1.62-1.72 % / h), by the end of the experiment it was 0.55-0.58 % / h. The growth kinetics of *Candida* sea yeast has been studied. It is shown that their growth rate is higher than that of bacteria. The values of biomass growth in yeasts have increased over time. It has been quantitatively confirmed that the colored forms of yeast organisms reproduce less intensively and this can affect the frequency of their occurrence. The obtained results can be used to calculate the self-cleaning ability of the water areas in which the hydrobiological cleaning systems are located or will be located. When working on active associations of microorganisms-destructors of pollutants, it is also necessary to take into account the speed and nature of their growth.

Key words: kinetic growth characteristics, marine yeasts, bacteria, hydrobiological cleaning systems, Black sea.