

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 4, № 4
2019**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 4, № 4
2019**

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

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

О.Е. Багрова, Е.В. Малышко, В.А. Твердислов

Об особенностях хиральных вторичных структур, определяющих функции белков 447

Ю.Д. Нечипуренко, Х.Л. Касерес

Концепции в молекулярной биофизике.....452

М.В. Астафурова, В.И. Астафуров

Физико-математическое доказательство иерархической индивидуальности живых структур 456

С.Н. Железнова, А.С. Малахов, Р.Г. Геворгиз

Измерение спектра поглощения плотных культур бентосных микроводорослей 463

Д.Н. Чернышев, Р.П. ТренкеншуМодель реконструкции спектра поглощения красной области *Spirulina platensis in vivo* по характеристикам растворов хлорофилла *a* и фикобилинов.....467**М.А. Суслов**

Метод исследования динамики водной проводимости в корнях интактных растений кукурузы в условиях повышенной концентрации углекислого газа.....472

А.А. Мосунов, В.А. Сало, Д.П. Воронин, М.П. Евстигнеев

Самоассоциация фуллерена и его комплексообразование с химиотерапевтическими препаратами – перспективное противоопухолевое средство..... 480

В.А. Кальпа, А.С. ЛелековОценка коэффициента абсорбции углерода культурой *Dunaliella viridis* Teod..... 490

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

В.А. Твердислов, М.Е. Мазуров, Л.В. Яковенко

О механизмах хиральности макроскопических систем..... 496

С.Д. Демухамедова

Квантовохимическое исследование комплексов двух таутомерных форм карнозина с кобальтом..... 505

Н.М. Зорин, М.И. Шевченко, А.С. Москвин

Моделирование внутриклеточного механизма возникновения и подавления сердечной аритмии 514

М.М. Васильев, Л.О. Костюкова Анализ взаимодействия фуллерена C_{60} с

органическими растворителями методами квантовой механики 523

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Я.В. Мегер, А.О. Лантушенко, Ю.В. Мухина, Ю.А. Яковлева, О.С. Ельцов**
Влияние структуры боковых цепей платиносодержащих соединений на их способность к ассоциации в растворе $CDCl_3$ 527
- Н.А. Касьяненко, И.В. Борисова, А.А. Екимов**
Анализ конформационных изменений ДНК при ее взаимодействии с координационными соединениями платины, содержащими аминокислоты 531
- Ю.О. Веляев, И.Б. Кометиани, Е.А. Булатникова**
Изучение некоторых физико-химических свойств аморфного диоксида кремния, полученного из нефелина, и возможность его применения в качестве энтеросорбента 537
- И.В. Головченко, О.В. Рогова, О.С. Завьялова, Е.В. Мирошниченко, В.В. Довгаленко**
Peculiarities of caffeine and caffeine sodium benzoate aqueous solution in presence of fullerene C_{60} 542
- И.В. Клименко, А.В. Лобанов**
Биосовместимые супрамолекулярные системы на основе хлорина e_6 : получение, физико-химические свойства 546
- В.Ф. Апельцин, А.И. Полетаев, Э.М. Трухан**
Магнитный векторный потенциал как модулятор химических и биологических процессов 550
- А.В. Тамашевский, Ю.М. Гармаза, Е.И. Белевич, Е.И. Слобожанина**
Участие металлотионеинов в поддержании жизнеспособности лейкозных лимфоцитов при модификации окислительно-восстановительного баланса 558
- Т.Г. Щербатюк, И.А. Чернигина, Е.С. Плеханова, А.Б. Гапеев**
Спонтанные и индуцированные повреждения ДНК в лейкоцитах крови крыс с карциномой почки РА при озono-фотодинамическом воздействии.....564

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

- А.А. Солдатов**
Активность Na^+ , K^+ -АТФазы и баланс одновалентных катионов в ядерных эритроцитах морских рыб в условиях гипоосмотической нагрузки (эксперименты *in vivo*) 570
- О.С. Завьялова, О.Р. Ластовенко, В.А. Лисютин, В.Л. Лучин, Н.В. Петренко, О.В. Рогова, К.А. Рыбакова, А.А. Ярошенко**
О воздействии скалярных и векторных компонент звукового поля на рыб и беспозвоночных 577
- Н.Н. Гурова, И.И. Дигурова, С.Д. Гусев**
Оценка влияния постоянно действующего факела ачинского НПЗ на морфологические параметры листьев березы и осины 585
- УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2019 ГОД** 590

CONTENTS

Volume 4, No. 4, 2019

GENERAL BIOPHYSICS

O.E. Bagrova, E.V. Malyshko, V.A. Tverdislov

On the features of chiral secondary structures determining the functions of proteins 447

Y.D. Nechipurenko, J.L. Caceres

Conceptions in molecular biophysics.....452

M.V. Astafurova, V.I. Astafurov

Physical and mathematical proof of the hierarchical individuality of living structures 456

S.N. Zheleznova, A.S. Malakhov, R.G. Gevorgiz

Measuring the absorption spectra of benthic diatom..... 463

D.N. Chernyshev, R.P. TrenkenshuModel of reconstruction of the absorption spectrum of the red region *Spirulina platensis* *in vivo* by characteristics of chlorophyll a and phycobilin solutions 467**M.A. Suslov**

The method of studying the dynamics of water conductivity in the roots of intact maize plants under elevated concentration of carbon dioxide 472

A.A. Mosunov, V.A. Salo, D.P. Voronin, M.P. Evstigneev

Self-assembly of fullerene and its complexes with chemotherapeutic drugs – perspective antineoplastic agents 480

V.A. Kalpa, A.S. LelekovEvaluation of the absorption coefficient of carbon culture *Dunaliella viridis* Teod..... 490

MODELLING IN BIOPHYSICS

V.A. Tverdislov, M.E. Mazurov, L.V. Yakovenko

About mechanisms of chirality of macroscopic systems 496

S.D. Demukhamedova

Quantum-chemical study of complexes of two tautomeric forms of carnosine with cobalt 505

N.M. Zorin, M.I. Shevchenko, A.S. Moskvina

Computer simulation of the intracellular mechanism of the cardiac arrhythmia creation and suppression 514

M.M. Vasiliev, L.O. KostyukovaAnalysis of the interaction of fullerene C₆₀ with organic solvents by quantum mechanics methods 523

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- Y.V. Meger, A.O. Lantushenko, Yu.V. Mukhina, Yu.A. Yakovleva, O.S. Eltcov**
Effect of side chain structure of platinum-containing complexes on their association ability in CDCL₃ solution 527
- N.A. Kasyanenko, I.V. Borisova, A.A. Ekimov**
Analysis of change in DNA conformation in complexes with coordination platinum compounds containing amino acids 531
- Yu.O. Velyaev, I.B. Kometiani, E.A. Bulatnikova**
Study of some physicochemical properties of amorphous silicon dioxide obtained from nepheline and the possibility of its use as an enterosorbent.....537
- I.V. Golovchenko, O.V. Rogova, O.S. Zav'yalova, E.V. Miroshnichenko, V.V. Dovgalenko**
Peculiarities of caffeine and caffeine sodium benzoate aqueous solution in presence of fullerene C₆₀ 542
- I.V. Klimenko, A.V. Lobanov**
Incompatible supramolecular systems based on chlorin e₆: preparation and physico-chemical properties 546
- V.F. Apeltsin, A.I. Poletaev, E.M. Truchan**
Magnetic vector potential as a modulator of chemical and biological processes 550
- A.V. Tamashevski, Y.M. Harmaza, K.I. Bialevich, E.I. Slobozhanina**
Role of metallotioneines in maintains of leukemic lymphocytes viability under redox-balance modification 558
- T.G. Shcherbatyuk, I.A. Chernigina, E.S. Plekhanova, A.B. Gapeyev**
Spontaneous and induced DNA damage in blood leukocytes of rats with RA kidney carcinoma under ozone-photodynamic treatment 564

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

- A.A. Soldatov**
The activity of Na⁺, K⁺-ATPase and the balance of monovalent cations in nuclear erythrocytes of marine fish under hypoosmotic load (experiments *in vivo*).....570
- O.S. Zavjalova, O.R. Lastovenko, V.A. Lisyutin, V.L. Luchin, N.V. Petrenko, K.A. Rybakova, O.V. Rogova, A.A. Jarochenko**
On the effect of scalar and vector components of the sound field on fish and invertebrates 577
- N.N. Gurova, I.I. Digurova, S.D. Gusev**
Evaluation of the influence of a constantly acting torch of the achinsk refinery on morphological parameters of birch and aspen leaves 585

INDEX OF ARTICLES PUBLISHED IN THE JOURNAL FOR 2019 590

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ХИРАЛЬНЫХ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Багрова О.Е., Малышко Е.В., Твердислов В.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: o-bagrova@mail.ru
Поступила в редакцию: 29.07.2019

Аннотация. Современные методы исследований позволяют изучить структуру биополимера, но они не раскрывают полностью механизмы структурообразования. Изучение этих механизмов представляет особый интерес для биофизики. Впервые получено распределение вторичных структур с учётом знака хиральности по полипептидной цепи белков из 4 функциональных классов: вирусные белки, изомеразы, шапероны, оксидоредуктазы. Выявлены общие для всех исследуемых классов закономерности, а также отдельные для каждого класса особенности строения. Произведена компьютерная обработка каждого отдельного белка, по результатам которой построены диаграммы распределения вторичных структур по отдельной цепи и произведено усреднение для функционального класса.

Ключевые слова: хиральность, белки, вторичная структура, α -спираль, β -лист.

Выяснение физических принципов формирования уникальных структур биомакромолекул и механизмов их функционирования на протяжении десятилетий остаётся актуальной проблемой молекулярной биофизики. Достижения биохимии и молекулярной биологии, успешное использование разнообразных физических методов в изучении биомолекулярных структур, математическое моделирование структур и взаимодействий в таких системах позволили достаточно много узнать о строении и функциях биомолекул. Вместе с тем, фундаментальные вопросы относительно механизмов внутримолекулярного и межмолекулярного структурообразования, работы макромолекул как молекулярных машин остаются в значительной степени невыясненными.

Настоящая работа посвящена выявлению закономерностей в распределении вторичных структур на полипептидной цепи белков. Исследования по выявлению закономерностей и соответствий между строением белка и его функциями могут позволить определять роль белков в химических реакциях посредством анализа только структуры их полипептидной цепи. Базисной позицией данной работы можно назвать учёт знака хиральности исследуемых структур. Хиральность играет одну из ключевых ролей в фолдинге белка, то есть в сворачивании полипептидной цепи. Так, данное исследование может повлиять на развитие теории фолдинга, в частности, при создании моделей структурообразования.

Попытки прогнозирования вторичных структур белков по известной первичной структуре проводились еще во второй половине прошлого столетия. В частности, в 1970-х годах Питер Чоу и Геральд Фасман сумели разработать метод прогнозирования вторичных структур с точностью в пределах от 50 до 60% [1]. Анализ наличия вторичных структур в белках встречается в значимой работе 1987-го года [2]. Однако в предыдущих исследованиях не было получено распределение структур по цепи, а только их количественное содержание в белке в целом. Кроме того, не учитывался знак хиральности вторичных структур белков.

Последовательность аминокислот в полипептидной цепи называют первичной структурой белка или пептида. Эта последовательность уникальна для каждого белка. Торчащие в разные стороны радикалы аминокислотных остатков определяют функцию белка и отчасти его пространственную организацию [3]. Полипептиды имеют свойство образовывать более сложные структуры: вторичные, третичные, четвертичные. Образование определённой конфигурации неразрывно связано с особенностями строения на предыдущем уровне. Третичная и четвертичная структуры играют важную роль в межмолекулярном взаимодействии, так как известно, что структура белка определяет его функцию. Для протекания реакции важны не только химические или физические свойства молекул, но и их геометрическое соответствие. Именно поэтому некоторые пары белков, участвующие в реакциях, характеризуются высоко специфичными взаимодействиями, подобными ключу и замку.

Однако важным критерием качественного функционирования белков является их принадлежность к определённому типу хиральности. С самого начала аминокислоты, составляющие белки, могут существовать в виде правых (D-тип) и левых (L-тип) энантиомеров [4]. Химически эти два типа не отличаются друг от друга, за исключением реакций с хиральными веществами. Тем не менее, молекулы разных типов могут отличаться биологическим действием в живых организмах. Например, использование широко распространённого в 1950-х годах снотворного на основе талидомида принесло трагические последствия. Талидомид также может существовать в двух формах. Однако одна из них, как и предполагалось, успокаивает, а другая может влиять на репликацию ДНК, что пагубно сказывается на потомстве [5].

Аминокислоты, как хиральные объекты, объединяются в хиральные структуры всё более высокого уровня организации. В настоящее время на кафедре биофизики физического факультета МГУ развивается концепция о закономерной смене знака хиральности в биологических структурах [6]. Установлено, что существует определённая закономерность при переходе с одного уровня структурной организации белков на более высокий,

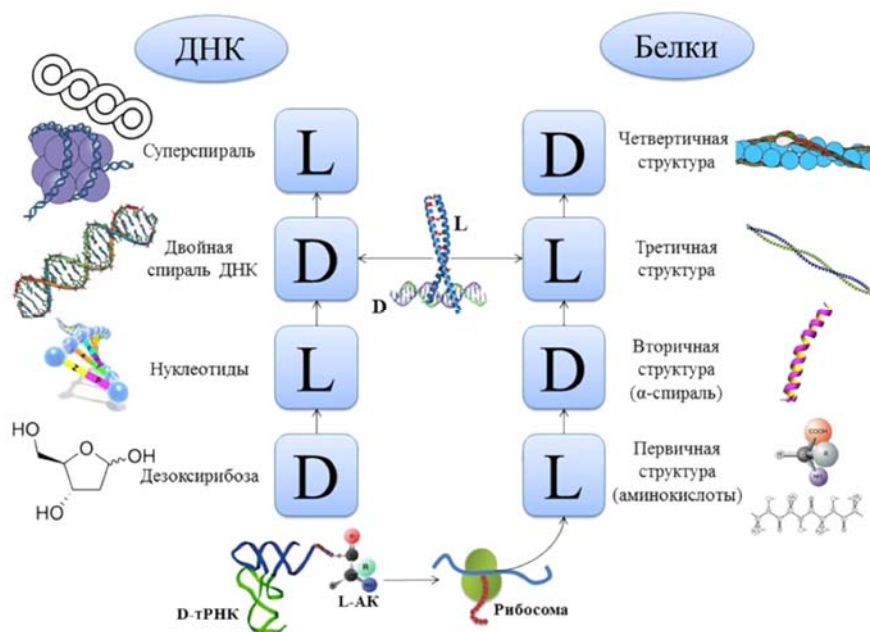


Рисунок 1. Периодическая таблица знакопеременных хиральных структур [1]

выражающаяся в смене знака хиральности от первичной до четвертичной структуры: L-D-L-D. Так, в первичной полипептидной цепи встречаются аминокислоты исключительно L-типа. На более высоком уровне организации белков, на уровне спиралей, преобладают структуры D-типа, ещё выше – третичные структуры L-типа и четвертичные – D-типа. Для ДНК (и РНК) наоборот: D-L-D-L. Эта закономерность представлена в виде «периодической таблицы» на рисунке 1.

Тот факт, что цепи белка построены из L-аминокислот, не означает полное отсутствие D-аминокислот в биологических системах. Это утверждение подразумевает, что именно L-аминокислоты выбираются транспортной РНК для синтеза цепи белка в рибосомах. В то же время D-аминокислоты скорее отвечают за гормональные, морфогенетические и другие процессы [7].

На данном этапе исследования нами проводился анализ исключительно вторичных структур в полипептидных цепях, при этом нерегулярные вторичные структуры (β-изгибы, полуповороты) исключены из анализа.

Подборка белков производилась с использованием электронной базы данных Protein Data Bank (PDB), которая позволяет исследовать трёхмерные структуры не только белков, но и нуклеиновых кислот. Данные для этой базы данных получены посредством рентгеновской кристаллографии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса и криоэлектронной микроскопии. Информация с сайта PDB позволяет учитывать спирали следующих типов: α, ω, π, γ, 3₁₀, 2₇, отдельно β-листы и полипролиновые спирали.

Структура молекул на электронном ресурсе представлена в виде текстового файла определённого формата (.pdb). Для обработки этих файлов был разработан специальный алгоритм и реализован посредством программы на языке C++:

- 1) Обработка pdb-файла с помощью программы: поиск строк со следующей информацией
 - Название белка
 - PDB ID белка
 - Тип вторичной структуры: спираль или β-лист;
 - Первая аминокислота вторичной структуры;
 - Последняя аминокислота вторичной структуры;
 - Идентификатор цепи;
 - Идентификатор типа спирали (для спирали);
 - Длина данной вторичной структуры;
 - Первая аминокислота цепи;
 - Последняя аминокислота цепи;
- 2) Получение текстового файла с нужными параметрами белков внутри одного функционального класса;
- 3) Расшифровка типов спиралей (для спирали) с помощью файла «PDB_file format» с электронного ресурса RCSB PDB;
- 4) Подсчёт длины каждой цепи;
- 5) Нормировка длины цепи (чтобы та была длиной в 100 единиц)
- 6) Пересчёт длины каждой вторичной структуры в новой нормировке;

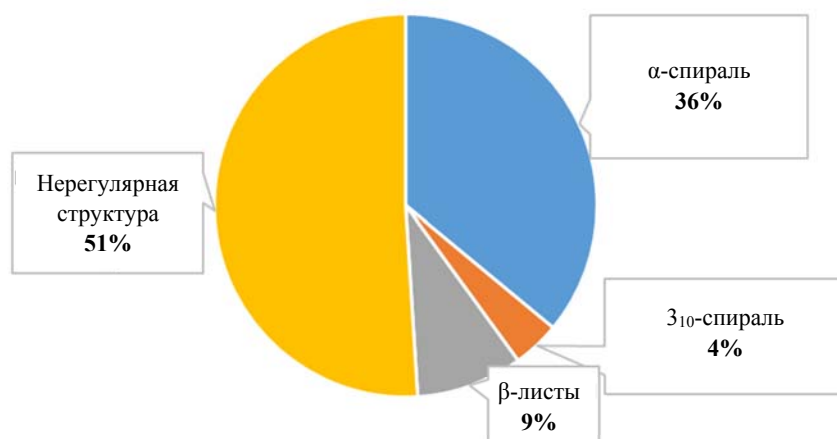


Рисунок 2. Количественное содержание вторичных структур в исследованных белках

- 7) Формирование таблицы результатов для отдельного функционального класса;
- 8) Построение диаграмм распределения вторичных структур по полипептидным цепям белков;
- 9) Усреднение результата (если в файле одного белка присутствует информация о нескольких его цепях)
- 10) Получение итоговых диаграмм распределения.

Для анализа в настоящей работе были выбраны 4 функциональных класса белков:

- 1) Вирусные белки. Учёт структуры вирусов способствует разработке более эффективных лекарств.
- 2) Изомеразы. Эти белки непосредственно превращают один тип энантиомеров в противоположный.
- 3) Шапероны. Исследования данного класса важны для развития теории фолдинга, так как одна из главных функций шаперонов состоит в восстановлении правильной нативной структуры.
- 4) Оксидоредуктазы. Этот класс является одним из самых многочисленных, поэтому его анализ позволяет построить более достоверную и полную картину распределения структур по цепям.

Суммарно было проанализировано 98 уникальных белковых структур: 25 структур вирусных белков, 15 структур шаперонов, 16 структур изомераз и 42 структуры оксидоредуктаз. Файлы с сайта PDB часто хранят в себе информацию о нескольких цепях одного белка, что позволяет получить более достоверный результат. Так, в сумме было проанализировано 325 цепей: 109 цепей вирусов, 40 шаперонов, 38 изомераз, 138 оксидоредуктаз, куда входит более 85 тысяч аминокислотных остатков.

В результате анализа было выявлено, что 51% аминокислотных остатков не образуют регулярные вторичные структуры, 40 % остатков входят в спирали, 36% из которых приходится на α -спирали и 4% на спирали 3_{10} , 9% остатков образуют β -листы. Полученное процентное соотношение приведено на рисунке 2.

Данный результат можно сравнить со значениями из исследований Чоу и Фасмана [1]. Согласно результатам их работы, на α -спирали должно приходиться 38% аминокислотных остатков, 20% на β -структуры и 42% на так называемые спонтанные кольца. Заметное расхождение по β -листам можно объяснить выборкой белков. В данной работе результаты основаны на анализе лишь четырёх функциональных классов белков, а количественное содержание тех или иных вторичных структур связано с функцией белка.

Также следует отметить, что все исследованные спирали относились к D-типу, то есть были правозакрученными, что в очередной раз подтверждает концепцию о закономерной смене знака хиральности. Однако в работе [2] показано, что в исследованных группой образцах в состав правозакрученных спиралей входят лишь 55,7% аминокислотных остатков. В первую очередь, это можно объяснить наличием в рассмотренных исследователями белках левых спиралей типа полипролин II, характерных рассмотренным функциональным классам.

Результаты анализа представлены в виде диаграмм распределения вторичных структур по цепям на рисунке 3.

Общая длина каждой цепи нормирована и представляет собой ось длиной в 100 ячеек. Для наглядности диаграммы разделены на 4 части. Глубина цвета и цифры ячеек отражают количество аминокислотных остатков, относящихся к данной структуре в единицах диаграммы.

На основе представленных диаграмм выявлено общее свойство, замеченное у исследованных биополимеров: преобладание нерегулярных участков в начале и в конце цепей, за исключением начала оксидоредуктаз, где наблюдается короткий экстремум по β -листам. Это наблюдение согласуется с представлением о белковой глобуле как гидрофобном ядре с гидрофильной оболочкой.

Также найдены закономерности для структуры цепей каждого из 4-х классов. Для вирусов характерно большое количество α -спиралей, особенно в первой половине цепи. Во второй половине это преобладание сменяется преобладанием спиралей 3_{10} . В первой четверти наблюдается экстремум по β -листам. Можно предположить, что большое количество α -спиралей у вирусных белков обеспечивает жесткость молекулы и направленность взаимодействия с инфицированной клеткой.

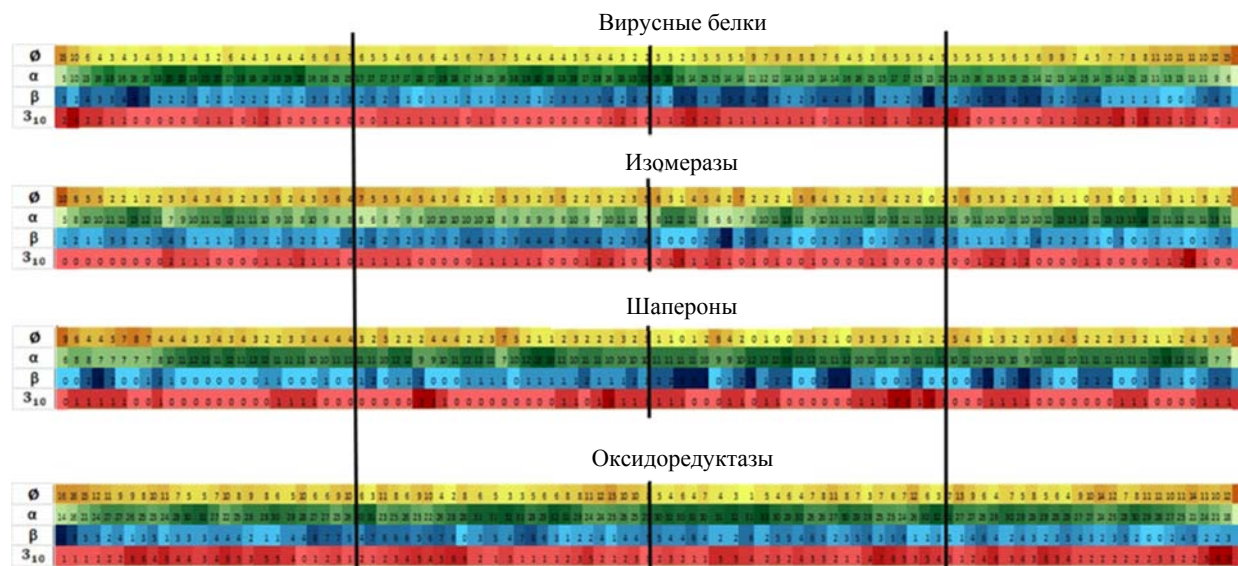


Рисунок 3. Диаграммы распределения: Ø (желтый) – нерегулярные участки, α (зелёный) – α-спирали, β (синий) – β-листы, 3₁₀ (красный) – спирали 3₁₀

У изомераз заметно скопление α-спиралей ближе к концу молекул, при этом явных максимумов по каким-либо вторичным структурам не наблюдается.

При рассмотрении шаперонов, было замечено несколько максимумов по β-структурам во всех четвертях, за исключением второй, где преобладают спирали 3₁₀. Наличие β-листов обеспечивает образование «бочонков» шаперонов, в которых происходит формирование нативной структуры белка.

Для оксидоредуктаз характерен экстремум по 3₁₀-спиралям ближе к концу цепи, а α-спирали расположены ближе к середине, в отличие от изомераз, хотя и те, и другие являются ферментами. Данные структурные свойства могут быть обусловлены особенностями ферментативной специфичности, связанной с переносом электронов.

В настоящей работе выявлены закономерности и особенности в распределении вторичных структур по полипептидным цепям белков выбранных функциональных классов: вирусные, изомеразы, шапероны, оксидоредуктазы.

Выявление закономерностей и соответствий между строением белка и его функциями в будущем может способствовать созданию новых бионических материалов, а также разработке более эффективных лекарственных препаратов. Дальнейшее изучение связи структуры и функций белков может позволить понять, как работают и взаимодействуют те или иные биополимеры. Также подобные исследования важны для понимания, как последовательность аминокислот, то есть первичная структура, приобретает определённую, нужную ей форму. Это позволит иметь представления о выполняемых белком функциях, имея информацию только о его строении, и создавать более совершенные модели фолдинга, решая фундаментальные проблемы биофизики.

Список литературы / References

1. Chou P.Y., Fasman G.D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1978, vol. 47, pp. 45-148.
2. Adzhubei A.A., Eisenmenge F.R., Tumanyan V.G., Zinke M., Brodzinski S., Esipova N.G. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1987, vol. 5, iss. 3.
3. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами*. М: КДУ, 2012, 491 с. [Finkelstein A.V., Ptitsyn O. B. *Protein physics: a course of lectures with color and stereoscopic illustrations and tasks*. М: KDU, 2012, 491 p. (In Russ.)]
4. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. *Биология: в 3 т. Т 1*. М.: Лаборатория знаний, 2018, 454 с. [Taylor D., Green N., Stout W. *Biology: in 3 vol. Vol. 1*. М.: Laboratory of knowledge, 2018, 454 p. (In Russ.)]
5. Солдатенков А.Т. *Основы органической химии лекарственных веществ*. М.: Химия, 2001, 192 с. [Soldatenkov A. T. *Fundamentals of organic chemistry of drugs*. М.: Chemistry, 2001, 192 p. (In Russ.)]
6. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А., Жулябина О.А., Яковенко Л.В. Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. *Биофизика*, 2017, т. 62, вып. 3, с. 421-434. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V., Ilchenko S.A., Zhulebino O.A., Yakovenko L.V. The periodic system of chiral structures in molecular biology. *Biophysics*, 2017, vol. 62, iss 3, pp. 421-434. (In Russ.)]
7. Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Яковенко Л.В. От симметрий – к законам эволюции.1. Хиральность как инструмент стратификации активных сред. *Биофизика*, 2012, т. 57, вып. 1, с. 146-154. [Tverdislov V.A., Sidorova A.E., Yakovenko L.V. From symmetries to the laws of evolution.1. Chirality as an instrument of stratification of the active medium. *Biofizika*, 2012, vol. 57, no. 1, pp.146-154. (In Russ.)]

ON THE FEATURES OF CHIRAL SECONDARY STRUCTURES DETERMINING THE FUNCTIONS OF PROTEINS**Bagrova O.E., Malyshko E.V., Tverdislov V.A.**

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory str., 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: o-bagrova@mail.ru

Abstract. Modern research methods allow us to study the structure of the biopolymer, but the mechanisms of structure formation are not clear for us. The study of these mechanisms is particular interest for Biophysics. In this paper, the distribution of secondary structures was considered taking into account the sign of chirality of the polypeptide chain of proteins from 4 functional classes: viral proteins, isomerases, chaperones, oxidoreductases. Common patterns for all classes and individual features of the structure for each class were found. Then computer processing of each protein was carried out. The distribution diagrams of each individual chain were constructed on the basis of the obtained results. As a result, several general patterns were revealed.

Key words: *chirality, proteins, secondary structure, α -helix, β -sheet.*

КОНЦЕПЦИИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОФИЗИКЕ

Нечипуренко Ю.Д.¹, Касерес Х.Л.²¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
ул. Вавилова, 32, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: nech99@mail.ru² Центр Нейронаук
ул. 25-ая, угол к 198-ой, Плайя, г. Гавана, Куба
Поступила в редакцию: 31.07.2019

Аннотация. В развитии биофизики особое место занимают концепции, или системы взглядов на явления, происходящие в живой клетке. Именно систематический взгляд на такие явления приводит нас к пониманию феномена жизни. За последние полвека сотрудниками кафедры биофизики физического факультета МГУ и соавторами был разработан целый ряд концепций, которые позволяют по-новому взглянуть на процессы, происходящие в клетке. Концепция «Белок-машина» (Шноль, Чернавский, Хургин) получила свое подтверждение в работах многих авторов, в том числе Льва Блюменфельда и Александра Тихонова. Концепция иерархии сил и взаимодействий (Есипова) легла в основу оригинального курса лекций по физике биополимеров, который уже более сорока лет читается на кафедре. Эта концепция получила дальнейшее развитие в работах Натальи Есиповой, Владимира Туманяна, Владимира Намиота и соавторов. Концепция матричного узнавания, развитая в работах Георгия Гурского и Александра Заседателева, получила подтверждение в цикле работ по взаимодействию лигандов с ДНК и привела к ряду важных результатов – от построения молекулярных и термодинамических моделей связывания лигандов с ДНК до открытия аллостерического эффекта ДНК. В последние годы развитие получила концепция хиральности, которую выдвинул Всеволод Твердислов, эта концепция позволяет по-новому взглянуть на систему макромолекулярных взаимодействий в клетке. Своё развитие и ряд интереснейших приложений получила концепция космофизических факторов, разработанная ранее Симоном Шнолем. Кафедра сформировала специалистов из других стран, таких как Германия, Польша, Словакия, Ирак, Куба. Большинство из них и поныне продолжают свои исследования в области молекулярной биофизики. При содействии Симона Шноля на кафедре была разработана модель химических колебаний, известной в мировой научной литературе как реакция Белоусова-Жаботинского, один из классических примеров биофизики нелинейных систем.

Ключевые слова: молекулярные машины, иерархии структур, кооперативное связывание лигандов, аллостерические эффекты, ДНК-белковые взаимодействия, космофизические факторы.

Во второй половине XX века в молекулярной биофизике появился целый ряд концепций, которые были связаны с кафедрой биофизики физического факультета МГУ. Понятие «концепция» отчасти вытеснило понятие «теории», причем под концепцией понимают как главную мысль теории, так и систему знаний, включающую целый ряд теорий. Переходя на язык образов, можно сравнить концепцию с хребтом той или иной науки (если науку можно уподобить живому организму). С другой стороны, при построении новой отрасли знаний концепцию можно сравнить с замыслом, своего рода архитектурным планом, или строительными лесами, если речь идёт о молодой науке. Вспомним слова Гёте «Суха теория, мой друг, а древо жизни вечно зеленеет» (перевод Холодковского): в этом смысле понятие концепции менее дискредитировано в научном сообществе и общественном мнении, оно менее претенциозно и более свежо. В последние годы в вузах России появился курс «Концепции современного естествознания». Концепция при таком прочтении – это именно система понимания, система взглядов, в которую могут быть включены те или иные теории и гипотезы. Концепции представляют собой по сути мировоззренческие системы, которые естественно входят в систему образования и поэтому именно концепции развиваются обычно в непосредственной близости от учебного процесса.

За время обучения на физическом факультете МГУ студенты получают как классическое физическое образование, так и возможность общения с преподавателями – исследователями, которые выдвигают свои концепции науки и преподавания. Новационность спецкурсов на кафедре биофизики определяется тем, что их читают действующие учёные: вопросы, которые они освещают, включают гипотезы и те представления, которые не вошли ещё в устоявшуюся систему знаний. В этом смысле важный урок студентам кафедры в 70-е годы XX века дал постоянный спор двух профессоров – заведующего кафедрой Льва Александровича Блюменфельда и прекрасного лектора Симона Эльевича Шноля. Этот спор вёлся на очень высоком уровне – и студенты видели воочию, с каким умом и тактом можно отстаивать свою точку зрения, уважая соперника. Споры велись вокруг разных тем, в частности, шла речь и о хемиосмотической теории Питера Митчелла, который получил за неё в 1978 году Нобелевскую премию. С другой стороны, Лев Блюменфельд разделял представления, которые развивал Симон Шноль с соавторами о белках как молекулярных машинах [1] и даже проводил эксперименты, подтверждающие эти представления [2, 3].

Со временем оказалось, что именно АТФ синтаза, которая осуществляет сопряжение переноса протонов и синтеза АТФ, представляет собой классический пример молекулярной машины – это по сути молекулярный мотор, в котором можно выделить статор и ротор (см. работу Романовского и Тихонова [4]). Лев Блюменфельд

вместе с Александром Тихоновым издали монографию, в которой развили концепции биофизической термодинамики [5]. К сожалению, до сих пор не издан курс лекций по физике биополимеров Натальи Георгиевны Есиповой. Этот курс основан целиком на оригинальных представлениях автора об иерархии сил и структур в молекулярных системах. Начиная с атомного уровня, Есипова прослеживает возникновение структур следующих уровней организации, в которых все большее значение имеют взаимодействия более слабые (например, диполь-дипольные или водородные связи). Часть идей Есипова изложила в работах с Владимиром Туманяном и Владимиром Намиотом и соавторами [6, 7]. Концепцию роли хиральности в биофизике разрабатывает сейчас заведующий кафедрой биофизики Всеволод Твердислов с соавторами. Эта концепция позволяет посмотреть на иерархию структур в клетке по-новому [8, 9].

Большое впечатление на студентов кафедры биофизики производили не только лекции преподавателей, но и отдельные выступления приглашенных лекторов из числа выпускников кафедры. В качестве примера можно привести лекцию Георгия Гурского, в которой он излагал новые подходы к белок-нуклеиновому узнаванию. Речь идет об оригинальной работе [10], в которой развиты представления о матричном характере узнавания: ДНК несёт на себе решётку донорно-акцепторных реакционных центров, к которой по принципу комплементарности подходит подобная же решётка полипептида. Такой подход хотя и не оказался универсальным, однако позволил объяснить связывание с ДНК ряда лигандов. Удалось не только построить молекулярные и термодинамические модели комплексов антибиотиков с нуклеиновыми кислотами (см. работы Гурского, Заседателева и соавторов), но и оценить энергию связывания при элементарном акте узнавания [11]. Дальнейшее развитие концепции матричного узнавания привело к синтезу целого ряда новых лигандов, специфичных к последовательности ДНК [12]. Изучение связывания лигандов с ДНК привело к открытию аллостерического эффекта ДНК и построению ряда моделей, объясняющих такой эффект при помощи представлений о кооперативных взаимодействиях между адсорбированными на ДНК лигандами (см. здесь [13, 14]).

На рисунке 1 показано схематически, как при помощи потенциала парных взаимодействий между ближайшими соседними молекулами лиганда можно формально описать аллостерический эффект ДНК. В этом случае потенциал взаимодействия $\Delta f(i) = -RT \ln (K' / K)$, где R – универсальная газовая постоянная; T – температура; i – расстояние между лигандами, связанными на ДНК.

Аллостерический эффект ДНК был одновременно обнаружен в работах Крылова с соавторами и Хогана с соавторами (см. [11, 14, 15]). Позже в работах Гурского, Заседателева и Нечипуренко было показано, как описывать дальнедействующие кооперативные эффекты при связывании лигандов с ДНК, получены оценки потенциала, характеризующего такие взаимодействия (заметим, что расстояние, на которое распространяется возмущение в ДНК, было оценено в несколько витков двойной спирали, а энергия возмущения определяется величиной потенциала: $-\Delta f(i) \sim 1 RT$). Если при связывании лигандов на молекулах ДНК в растворе были обнаружены кооперативные взаимодействия, которые описывались в рамках одномерной модели Изинга, то при анализе связывания молекул мишеней на поверхности микрочипа были обнаружены кооперативные взаимодействия, которые описывались уже в рамках двумерной модели Изинга [16, 17].

Симон Эльевич Шноль не только инициировал ряд работ, которые далее получили широкое международное признание (например, математическое описание реакции Белоусова, которая позже стала называться реакцией Белоусова-Жаботинского), но и сам разработал ряд оригинальных концепций (см. [18]). Кафедра сформировала специалистов из других стран. Большинство из них и поныне продолжают свои исследования в области

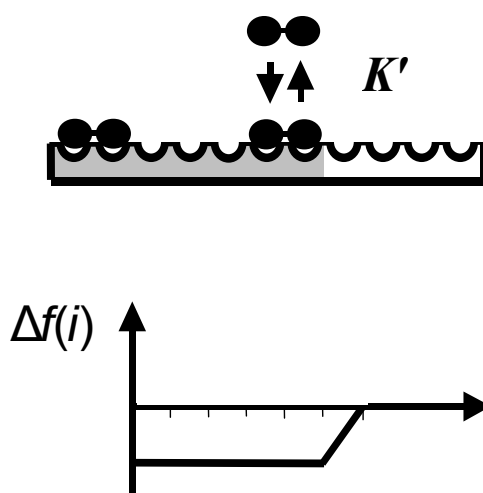


Рисунок 1. Схема, иллюстрирующая аллостерический эффект ДНК. Вверху показана матрица ДНК. Связывание первого лиганда на матрице (показан слева) происходит с равновесной константой K . В результате такого связывания участок матрицы переходит в возмущенное состояние (показано серым цветом). Связывание последующего лиганда на расстоянии меньше, чем 6 пар нуклеотидов, характеризуется измененной константой K' . Внизу представлен потенциал прямоугольной формы $\Delta f(i)$, описывающий в этом случае взаимодействия между лигандами, адсорбированными на ДНК (см. [14])

молекулярной биофизики, поддерживая контакт с кафедрой. Среди них – Тибор Гианик из Словакии [19], Салам Эль-Кардаги из Ирака [20, 21], Мишель Хентшель из Германии [22, 23] и Хосе Касерес из Кубы [23].

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013 - 2020 годы (темы №01201363818 и № 01201363820) и также грантом Президиума РАН по Молекулярной и клеточной биологии.

Список литературы / References:

1. Чернавский Д.С., Хургин Ю.И., Шноль С.Э. Молекула белка-фермента как механическая система *Молекулярная биология*, 1967, т. 1, с. 419-425. [Chernavskii D.S., Khurgin Y.I., Shnoll S.E. The molecule of enzyme as a mechanical system. *Mol. Biol. (Moscow)*, 1967, no. 1, pp. 419-425. (In Russ.)]
2. Блюменфельд Л.А. *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики*. URSS, 2010, 160 с. [Blumenfeld L.A. *Solvable and unsolvable problems of biological physics*. USSR, 2010, 160 p. (In Russ.)]
3. Нечипоренко Ю., Режабек Б. Нанороботы живой клетки. *Биомолекула*, 2017. URL: <https://biomolecula.ru/articles/nanoroboty-i-zhizn>. [Nechiporenko Yu., Rezhabeck B. Living Cell Nanorobots. *Biomolecula*, 2007, URL: <https://biomolecula.ru/articles/nanoroboty-i-zhizn>. (In Russ.)]
4. Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза — вращающийся молекулярный мотор. *Успехи физических наук*, 2010, т. 180, с. 931-956. [Romanovsky Y.M., Tikhonov A.N. Molecular energy transducers of the living cell. Proton ATP synthase: a rotating molecular motor. *Physics-Uspekhi*, 2010, vol. 53, pp. 893-914.]
5. Blumenfeld L.A., Tikhonov A.N. *Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes. Molecular Machines of the Living Cell*. Springer-Verlag, New York, 1994.
6. Намиот В.А., Батыновский А.В., Филатов И.В., Туманян В.Г. Дальнодействующие взаимодействия и принципы молекулярного распознавания на разных уровнях строения биосистем. *Биофизика*, 2016, т. 61, с. 54-59. [Namiot V.A., Batyanovskii A.V., Filatov I.V., Tumanyan V.G., Esipova N.G. Long-Distance Interactions and Principles of Molecular Recognition at Various Biosystem Organization Levels. *Biophysics*, 2016, vol. 61, pp. 47-51.]
7. Батыновский А.В., Намиот В.А., Филатов И.В., Молдавер М.В., Анашкина А.А., Туманян В.Г., Есипова Н.Г., Волоотовский И.Д. Конформационно-стабильные сегменты в спиральных структурах полипептидных цепей белков и их роль при формировании структур высших уровней. *Биофизика*, 2013, т. 58, с. 1969-1973. [Batyanovsky A.V., Namiot V.A., Filatov I.V., Moldaver M.V., Anashkina A.A., Tumanyan V.G., Esipova N.G., Volotovskiy I.D. Conformational-stable segments in the helical structures of polypeptide chains of proteins and their role in the formation of higher-level structures. *Biofizika*, 2013, vol. 58, pp. 1969-1973. (In Russ.)]
8. Твердислов В.А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах. *Биофизика*, 2013, т. 58, с. 159-164. [Tverdislov V.A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 128-132.]
9. Твердислов В.А., Малышко Е.В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы. *Успехи физических наук*, 2019, т. 189, с. 375-385. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V. On regularities in the spontaneous formation of structural hierarchies in chiral systems of nonliving and living matter. *Physics-Uspekhi*, 2019, vol. 62, pp. 354-364.]
10. Гурский Г.В., Туманян В.Г., Заседателев А.С., Жузе А.Л., Гроховский С.Л., Готтих Б.П. Код, управляющий специфическим связыванием регуляторных белков с ДНК, и структура стереоспецифических участков регуляторных белков. *Молекулярная биология*, 1975, т. 9, с. 635-651. [Gurskii G.V., Tumanian V.G., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Grokhovskii S.L., Gottikh B.P. A code governing specific binding of regulatory proteins to DNA and structure of stereospecific sites of regulatory proteins. *Molekuliarnaia biologia*, 1975, vol. 9, pp. 635-651. (In Russ.)]
11. Krylov A.S., Zasedatelev A.S., Grokhovsky S.L., Zhuze A.L., Gursky G.V. and Gottich B.P. Quantitive estimation of the contribution of pyrrolcarboxamide groups of the antibiotic distamycin A into specificity of its binding to DNA AT pairs. *Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 6, pp. 289-304.
12. Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L., Khorlin A.A., Grokhovsky S.L., Streltsov S.A., Surovaya A.N., Nikitin S.M., Krylov A.S., Retchinsky V.O., Mikhailov M.V., Beabealashvili R.S., Gottich B.P. Synthetic sequence-specific ligands. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1983, vol. 47, pp. 367-378.
13. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. Термодинамические модели связывания лигандов с ДНК. *Биофизика*, 2003, т. 48, с. 773-796. [Nechipurenko Yu.D., Gursky G.V. Thermodynamic models of ligand binding to nucleic acids. *Biophysics*, 2003, vol. 48, pp. 717-740.]
14. Нечипуренко Ю.Д. *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами*. Москва-Ижевск, ИКИ, 2015, 188 с. [Nechipurenko Yu.D. *Analysis of the binding of biologically active compounds with nucleic acids*. Moscow-Izhevsk, IKI, 2015. 188 p. (In Russ.)]
15. Hogan M., Dattagupta N., Crothers D.M. Transmission of allosteric effects in DNA. *Nature*. 1979, vol. 278, p. 521.
16. Нечипуренко Ю.Д. Применение статистической термодинамики для анализа связывания лигандов с ДНК и олигонуклеотидов на микрочипах. В сборнике: *Физико-химические механизмы и регуляция процессов трансформации энергии в биологических структурах*. М.-Ижевск: ИКИ, 2017, 522 с. [Nechipurenko Yu.D. The use of statistical thermodynamics to analyze the binding of ligands to DNA and oligonucleotides on microchips. In the

collection: *Physical and chemical mechanisms and regulation of energy transformation processes in biological structures*. Moscow-Izhevsk: IKI, 2017, 522 p. (In Russ.)]

17. Stirmanov Y.V., Matveeva O.V., Nechipurenko Y.D. Two-dimensional Ising Model for Microarray Hybridization: Cooperative Interactions between Bound Target Molecules. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2018, vol. 37, pp. 3103-3108.

18. Shnoll S.E. *Cosmophysical Factors in Stochastic Processes*. ARPR, New Mexico, USA, 2012, 433 p.

19. Evtugyn G., Porfireva A., Stepanova V., Sitdikov R., Stoikov I., Nikolelis D., Hianik T. Electrochemical aptasensor based on polycarboxylic macrocycle modified with Neutral red for aflatoxin B1 detection. *Electroanalysis*, 2014, vol. 26, pp. 2100-2109.

20. Lüersen K., Eschbach ML, Haider N, Karlberg T, Walter RD, Al-Karadaghi S. Cloning, expression, characterisation and three-dimensional structure determination of *Caenorhabditis elegans* spermidine synthase. *FEBS letters*, 2005, vol. 579, pp. 6037-43.

21. Dufe V.T., Qiu W., Müller I.B., Hui R., Walter R.D., Al-Karadaghi S. Crystal structure of *Plasmodium falciparum* spermidine synthase in complex with the substrate decarboxylated S-adenosylmethionine and the potent inhibitors 4MCHA and AdoDATO. *Journal of Molecular Biology*, 2007, vol. 373, pp. 167-77.

22. Bittner M-I., Wiedenmann N., Bucher S., Hentschel M., Mix M., Rücker G., Weber W.A., Meyer P.T., Werner M., Grosu A-L., Kayser G. Analysis of relation between hypoxia PET imaging and tissue-based biomarkers during head and neck radiochemotherapy, *Acta Oncologica*, 2016, DOI: 10.1080/0284186X.2016.1219046.

23. Prenosil G.A., Weitzel T., Hentschel M., Klaeser B., Krause T. Transconvolution and the virtual positron emission tomography – A new method for cross calibration in quantitative PET/CT imaging. *Med. Phys.*, 2013, vol. 40, p. 062503.

24. Cosic I., Caceres J.L.H., Cosic D. Possibility to interfere with malaria parasite activity using specific electromagnetic frequencies. *EPJ Nonlinear Biomedical Physics*, 2016, vol. 3, p. 11.

CONCEPTIONS IN MOLECULAR BIOPHYSICS

Nechipurenko Y.D.¹, Caceres J.L.²

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences
Moscow, 119991, Russia; e-mail: nech99@mail.ru

² Cuban Neurosciences Center
Calle 25 esquin q 198, Playa, La Habana, Cuba

Abstract. In the development of biophysics, a special place corresponds to concepts, or systems of views regarding processes occurring in a living cell. Precisely, a systematic view of such processes leads us to an understanding of the phenomenon of life. In the twentieth century, the staff and co-authors of the Department of Biophysics at the Faculty of Physics of Moscow “Lomonosov” University developed a number of concepts that allow to take a fresh look at the processes occurring in a cell. The concept of “Protein Machine” (Shnoll, Chernavsky, Khurgin) was confirmed in the works of many authors, including Lev Blumenfeld and Alexander Tikhonov. The concept of hierarchy of forces and interactions (Esipova) formed the basis of the original course of lectures on the physics of biopolymers, which has been delivered at the Department for more than forty years and was further developed in the works of Natalia Esipova, Vladimir Tumanyan and Vladimir Namiot. The concept of matrix recognition, developed in the works of Georgy Gursky, Alexander Zasedatelev and collaborators, was confirmed in the cycle of works on the interaction of ligands with DNA and led to a number of important results – from the construction of molecular and thermodynamic models of ligand binding to DNA to the discovery of the allosteric effect of DNA. In recent years, the concept of chirality (Vsevolod Tverdislov) has been developed, which makes it possible to take a new look at the system of macromolecular interactions in the cell. The concept of cosmic-physical factors, developed earlier by Simon Shnoll, has found further development and a number of interesting applications. The department has formed specialists from other countries, such as Germany, Poland, Slovakia, Iraq and Cuba. Most of them still continue their research in the field of molecular biophysics. With the assistance of Simon Shnoll, the department developed a model of chemical oscillations, known in the world scientific literature as the Belousov-Zhabotinsky Reaction, one of the classic examples of biophysical of nonlinear systems.

Key words: molecular machines, hierarchies of structures, cooperativity, allosteric effects, DNA-protein interactions, cosmic-physical factors.

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ИЕРАРХИЧЕСКОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОСТИ ЖИВЫХ СТРУКТУР

Астафурова М.В.¹, Астафуров В.И.²

¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»

ул. Мясницкая, 20, г. Москва, 101000, РФ; e-mail: astafurova.maria@mail.ru

² Научно-технический центр радиационно-химической безопасности и гигиены России

г. Москва, РФ

Поступила в редакцию: 01.08.2019

Аннотация. В статье дано обоснование и рассмотрены основные положения пространственно-электромагнитной модели материального континуума. Данная модель и полученные уравнения составляют основу новой научной концепции, согласно которой в природе существует фундаментальное биологическое взаимодействие. Получено физико-математическое доказательство иерархической индивидуальности живых форм материи. Тезис о существовании фундаментального биологического взаимодействия меняет сложившиеся представления о происхождении и эволюции живых форм. Зарождение жизни не является случайным процессом и регулируется природными волновыми процессами. При благоприятных физико-химических условиях среды может происходить качественный переход от химической к биологической форме материи с образованием первичных живых структур.

Ключевые слова: *пространственно-электромагнитная модель, фундаментальные взаимодействия, биологическое взаимодействие, иерархия структур, живые структуры, волновые процессы, миллиметровые волны, происхождение жизни.*

Введение.

Вопросы о происхождении жизни, иерархическом статусе живых структур и физической природе биоинформационных взаимодействий составляют одну из важнейших проблем естествознания. С точки зрения принятых научных представлений процессы гомеостаза живых структур не имеют принципиальной специфики и могут быть описаны и смоделированы на основе известных законов физики и химии. Однако накопленный массив наблюдательных и экспериментальных данных, полученных при изучении жизненных процессов и эволюции живых структур, а также ряд выполненных теоретических изысканий свидетельствуют в пользу принципиальной индивидуальности биологической формы движения материи.

До последнего времени оставался открытым вопрос о теоретическом обосновании иерархической индивидуальности живых структур и о существовании силового взаимодействия, характерного для данной иерархии и, возможно, определяющего ее формирование. Разработка пространственно-электромагнитной модели материального континуума [1, 2] позволила подойти к решению данного вопроса с новых позиций. Новая модель положена в основу научной концепции, согласно которой существует фундаментальное биологическое взаимодействие, влияющее на гомеостаз живых структур [3].

Тезис о существовании фундаментального биологического взаимодействия имеет принципиальное философское значение и меняет сложившиеся представления о происхождении и эволюции живых форм. Зарождение жизни не является случайным процессом и регулируется природными волновыми процессами. В природе существует определенный спектр излучений, благодаря которым при благоприятных физико-химических условиях среды может происходить качественный переход от химической к биологической форме материи с образованием первичных живых структур. Таким образом, раскрывается движущая сила перехода от неживой материи к живой, что является важным дополнением теории А.И. Опарина [4].

В настоящей статье дано обоснование и рассмотрены основные положения пространственно-электромагнитной модели, проведен анализ уравнений, связывающих пространственные параметры фундаментальных иерархических структур и силовых параметров фундаментальных взаимодействий со свойствами физического вакуума, рассмотрены основные биофизические следствия из данной модели и полученных на ее основе уравнений.

Работа является обобщением и развитием исследований [1-3, 5].

1. Обоснование используемой модели и ее основные положения.

1.1. Исходные требования к модели.

Рабочая модель материального континуума, отображающая действительность, должна обладать внутренней потенцией, обеспечивающей генерацию волновых процессов, возможность образования тел вращения, развертывание иерархии материальных структур.

Новейшие открытия в области космологии показывают, что физический вакуум превосходит по плотности энергии все другие формы космической материи и управляет динамикой космологического расширения [6]. Логично предположить, что физический вакуум является определяющей формой материального континуума и что именно в его структуре следует искать первопричину материального самодвижения и законы построения иерархических систем. Вещество и физический вакуум взаимосвязаны и образуют единую систему.

При построении искомой модели разработчики руководствовались основополагающим тезисом, согласно которому всякое движение является самодвижением материи, присуще любой части материального континуума и проявляется в объеме любой малости. Другими словами, все законы движения и саморегулирования заложены в самой материи, являются следствием ее свойств.

Источником и причиной материального самодвижения является «самодействие материи самое на себя», то есть, взаимодействие некоторых материальных сущностей (или первичных структурных элементов), называемых нами «атрибутами», «первичными фундаментальными свойствами», «формами существования» материи. Эти материальные сущности взаимосвязаны и, по нашему мнению, неотделимы друг от друга.

Под первичными фундаментальными свойствами материи следует понимать такие ее неотъемлемые свойства, которые присущи ей изначально и проявляются тем или иным образом во всех процессах, явлениях и структурах без исключения.

Таким образом, для построения рабочей модели материального континуума, отображающей действительность, необходимо выявить и охарактеризовать первичные фундаментальные свойства (атрибуты) материи, которые составляют структурную основу материального континуума и обуславливают самодвижение материи.

При решении этой задачи разработчики модели столкнулись с проблемой природы времени.

1.2. О природе времени.

Вопрос о природе времени является чрезвычайно сложным. Это признавал еще Аристотель, который пытался дать логически безупречное определение времени, но так и не смог этого сделать. Он писал в одном из трактатов: «А что такое время и какова его природа, одинаково неясно как из того, что нам передано от других, так и из того, что нам пришлось разобрать раньше».

Существуют два диаметрально противоположных взгляда на природу времени: 1) время – свойство материи, ее неотъемлемый атрибут; 2) время – физический параметр, характеризующий относительную длительность процессов и явлений.

К концу XIX века в философии и естествознании сформировалось практически общепринятое представление о времени как о первичном фундаментальном свойстве материи, форме ее существования. Эта точка зрения выражена в работе В.И. Ленина «Материализм и эмпириокритицизм» следующим образом: «В мире нет ничего, кроме движущейся материи, и движущаяся материя не может двигаться иначе, как в пространстве и во времени» [7]. То есть, пространство и время рассматриваются как сущности равного статуса, что предполагает возможность их объединения во взаимосвязанную конструкцию при построении модели материального континуума.

Такое объединение было выполнено немецким математиком Германом Минковским (1864-1909), который сформулировал тезис о неразрывном единстве пространственных и временных величин и развил представление о четырехмерном пространстве-времени, как о реальной форме существования физического мира. Ученый провозгласил: «Отныне время само по себе и пространство само по себе становятся пустой фикцией, и только единение их сохраняет шанс на реальность» [8].

Благодаря новаторским работам Альберта Эйнштейна (1879-1955), математическая модель Минковского «четырёхмерное пространство-время» была распространена на весь мир физических явлений [9, 10].

Пространство и время рассматриваются в данной модели как атрибуты материи и взаимосвязанные компоненты материального континуума. Система аксиом приписывает пространству-времени определенную метрику, топологическую структуру, связность. С геометрией пространства-времени связывают гравитационные эффекты.

Однако объединять пространство и время в единый континуум можно только в том случае, если оба эти свойства «равноправны» по статусу, действительно являются атрибутами материи, ее первичными фундаментальными свойствами. При невыполнении этого условия такое объединение следует считать некорректным действием.

Рассмотрение генезиса представления о времени и его свойств приводит к выводу, что время не существует само по себе, в отрыве от движения, и его нельзя рассматривать в качестве активного действующего начала. Время является физическим параметром, отображающим волновую природу материального движения. Параметр времени был введен человеком на определенной стадии развития общества, чтобы сравнивать повторяющиеся явления и прогнозировать наступление ожидаемых событий. Понятие «времени» отождествлялось с повторяемостью природных процессов и явлений, жизненным циклом человека, сменой поколений, а также с темпом движений. Исходными и главными периодическими явлениями для человека были, естественно, восход и заход Солнца, приливы-отливы, смена фаз Луны и смена времен года.

Измерение длительности процессов и явлений осуществляется посредством сопоставления с каким-либо природным периодическим процессом, условно принимаемым в качестве «представителя» и эталона времени. Время определяется числом периодов физического процесса. Все попытки ученых дать определение времени, в конечном счете, сводятся к рассмотрению и сопоставлению природных периодических процессов, таких как движение Земли вокруг Солнца, вращение Земли вокруг собственной оси, изменение фаз Луны, качания маятника, колебания кристалла кварца, колебательные движения атомов и молекул, внутриатомные колебания и т.д.

Таким образом, время является внешней характеристикой движения. В этой трактовке природы времени мы, по сути, следуем Аристотелю, который определял время как «число движений по отношению к предыдущему и

последующему» и делал вывод, что «время не есть движение, а является им постольку, поскольку движение имеет число» [11]. То есть, он рассматривал время как некоторую меру движения.

Об относительности времени отчетливо говорил еще в V веке один из отцов христианской церкви, теолог и философ Аврелий Августин (354-430): «Я слышал, как говорили одному ученому: “Движение луны, солнца и звезд – вот время”. Я, однако, не согласен. Почему, в самом деле, движения других тел не могли бы быть также временем? ... Светила небесные — это знаки, определяющие время, годы, дни; это правда, но, остерегаясь сказать, что оборот деревянного колеса — и есть день, я все-таки не стал бы спорить, что это не время» [9, с. 54].

1.3. Обоснование необходимости разработки модели, отличной от модели «четырёхмерное пространство-время».

Таким образом, в отличие от пространства (протяженности), которое является первичным свойством материи и фундаментальным свойством физического мира, время является внешней характеристикой движения, и его нельзя рассматривать как атрибут материи, ее первичное свойство, форму ее существования. Вследствие этого, объединение пространства и времени в единую конструкцию, претендующую на отображение природы материального континуума, неправомерно как с логической, так и с физической точки зрения [1, 2, 12].

Отметим также два других существенных критерия, препятствующих использованию пространственно-временной модели Минковского-Эйнштейна в качестве рабочей модели материального континуума:

- данная модель не содержит внутреннего созидательного противоречия и по этой причине не способна обеспечить протекание процессов самодвижения и саморазвития. Для осуществления любого вида движения этой модели требуется внешний толчок, а таким толчком может быть только внешнее нематериальное воздействие;

- время, даже если предположить, что оно является атрибутом материи и фундаментальным свойством физического мира, никоим образом не может являться источником волновых процессов и причиной образования в природе тел вращения [13].

Таким образом, приходим к выводу, что используемая в современной теоретической физике и космологии модель «четырёхмерное пространство-время» является чисто умозрительной математической конструкцией, не имеющей отношения к физической реальности.

1.4. Об «электромагнитном свойстве» материи.

Для построения непротиворечивой модели физического вакуума (и материального континуума в целом) необходимо выявить реально существующее фундаментальное свойство материи (отличное от времени, не являющееся таковым свойством), которое в органическом единстве с пространством составляет структурную основу материального континуума и источник самодвижения материи.

Однако существует ли такое свойство?

В работе [13] показано, что первичное фундаментальное свойство материи, взаимосвязанное с пространством, в действительности существует. Об этом свидетельствует образование в природе волновых процессов и таких тел вращения, как звезды и планеты. В поиске физической природы этого свойства автор работы обращает внимание на такие явления, как электрический заряд, электрическое и магнитное поле, электромагнитные волны. Эти явления, в том или ином виде, проявляются в каждом объекте и процессе физического мира. Например, известно, что все пространство Вселенной заполнено электромагнитным излучением различного происхождения с длинами волн в диапазоне от километров до долей ангстрема. Также известно, что все вещество Вселенной содержит электрически заряженные частицы. Очевидно, что все подобные явления обусловлены существованием некоторого фундаментального свойства материи. Это свойство, с учетом характера его проявления, предложено называть «электромагнитным свойством».

1.5. Пространственно-электромагнитная модель.

В работах [1, 2] концепция о существовании «электромагнитного свойства» материи была принята за основу, что позволило создать логически непротиворечивую пространственно-электромагнитную модель физического вакуума. В рамках данной модели пространство (протяженность) и электромагнитное свойство материи рассматриваются как ее первичные фундаментальные свойства, которые в органическом единстве и взаимодействии друг с другом составляют структурную основу материального континуума и источник самодвижения материи. Таким образом, физический мир рассматривается в модели как пространственно-электромагнитный континуум. Физический вакуум является материальной субстанцией, взаимосвязан с веществом и образует с ним единую систему.

Физический вакуум (и материальный континуум в целом) представлен в модели как волновой векторный пространственно-электромагнитный континуум, в котором пространственный вектор $\mathbf{R}$, имеющий три составляющих, характеризует пространство, а электромагнитный вектор $\mathbf{Q}$, имеющий две составляющих, характеризует электромагнитное свойство материи. Число составляющих вектора $\mathbf{R}$ ($f_R = 3$) соответствует мерности наблюдаемого пространства. Число составляющих вектора $\mathbf{Q}$ ($f_Q = 2$) соответствует двум видам реально наблюдаемых электрических зарядов и магнитных полюсов.

С учетом тезиса о всеобщности волнового движения пространственно-электромагнитная модель приобретает дискретный характер. Физический вакуум и материальный мир в целом рассматриваются как совокупность взаимосвязанных волновых объектов (осцилляторов). Данная совокупность воспринимается нами как неразрывный материальный континуум.

Взаимодействуя друг с другом, природные осцилляторы образуют иерархические структуры. Ведущие осцилляторы качественно отличающихся иерархических уровней материального взаимодействия (по-видимому,

и определяющие формирование этих уровней) названы в модели фундаментальными осцилляторами. Наименьший природный («абсолютный») осциллятор является элементарной ячейкой физического вакуума.

Расчет показывает, что между структурными компонентами абсолютного осциллятора действуют связывающие силы столь большие по величине, что это обуславливает принципиальную невозможность разделения данных компонентов, по крайней мере, в рамках современных теоретических представлений. Это обстоятельство во многом проливает свет на проблему конфайнмента.

Отказ от модели Минковского-Эйнштейна «четырехмерное пространство-время» и переход к пространственно-электромагнитной модели материального континуума открывает возможность решения ряда принципиальных проблем в области естествознания, ранее не поддающихся решению. В частности, на основе данной модели были выведены уравнения, описывающие взаимосвязь пространственных параметров иерархических структур, силовых параметров фундаментальных взаимодействий и характеристических параметров физического вакуума.

Вывод уравнений представлен в работах [1, 2].

2. Уравнение, связывающее пространственные параметры фундаментальных иерархических структур, и полученные расчетные данные.

Уравнение, связывающее пространственные параметры фундаментальных иерархических структур с характеристическими параметрами (свойствами) физического вакуума, имеет вид (в логарифмической форме):

$$\log R_i = \log R_{abc} + f_R^i \cdot \log K_0, \quad (1)$$

где R_{abc} – радиус абсолютного осциллятора; R_i – радиус i -го фундаментального осциллятора; K_0 – константа, характеризующая пространственно-электромагнитный континуум ($K_0 = f_R / f_Q$); i – фундаментальное квантовое число, принимающее целочисленные значения от 0 до $(f_R + f_Q)$: $i = 0, 1, 2, 3, 4, 5$.

Под свойствами физического вакуума понимается его пространственно-электромагнитная природа и мерность его структурных компонентов.

С увеличением числа i разворачивается последовательность фундаментальных иерархических уровней, расширяющихся по структуре и пространственному масштабу.

Поставим каждому значению i в соответствие определенную иерархическую систему:

$i = 0$ – возбужденное состояние абсолютного осциллятора;

$i = 1$ – субнуклонная система (элементы внутренней структуры адронов);

$i = 2$ – нуклонная или ядерная система (нуклон и совокупность атомных ядер);

$i = 3$ – атомно-молекулярная система (электрон и вся совокупность атомов, молекул и их ассоциаций);

$i = 4$ – биологическая система (совокупность объектов, имеющих размер, характерный для живых структур);

$i = 5$ – космическая или гравитационная система (космические макроструктуры, Метагалактика).

Будем считать, что каждый фундаментальный осциллятор в уравнении (1) является главным структурным представителем (ведущим волновым объектом) соответствующей иерархической системы.

Примем для атомно-молекулярной иерархической системы $R_3 = \lambda_{компт} / 2$, где $\lambda_{компт}$ – комптоновская длина волн электрона.

Подставив в уравнение (1) численные значения параметров K_0, f_R, i, R_3 , получаем $R_{abc} = 2,135 \cdot 10^{-17}$ м.

При изменении i от 1 до 5 получаем следующие значения параметров R_i (в метрах): $R_1 = 7,206 \cdot 10^{-17}$, $R_2 = 8,209 \cdot 10^{-16}$, $R_3 = 1,213 \cdot 10^{-12}$, $R_4 = 3,916 \cdot 10^{-3}$, $R_5 = 1,317 \cdot 10^{26}$.

Значению $i = 4$ соответствует фундаментальный осциллятор радиусом $R_4 = 3,9$ мм. Полученная расчетная величина радиуса фундаментального волнового объекта находится в диапазоне, характерном для размеров живых структур.

Полученный результат можно рассматривать как доказательство иерархической индивидуальности структур, относящихся к биологической форме движения материи.

Однако возникает вопрос: имеет ли фундаментальный осциллятор иерархического уровня $i = 4$ непосредственное отношение к функционированию живых структур?

2.1. О биологической активности электромагнитного излучения миллиметрового диапазона

Очевидно, что внутреннее квантованное движение структурных компонентов фундаментального осциллятора радиусом R_4 должно приводить к образованию электромагнитного излучения миллиметрового диапазона, равномерно заполняющего материальный континуум. Согласно оценке, основная длина волны, генерируемая данным осциллятором, равна ~ 2 мм.

Предсказание модели находит экспериментальное подтверждение. Природное электромагнитное излучение в области миллиметровых длин волн действительно существует и равномерно заполняет наблюдаемую часть Метагалактики. Максимум в спектре излучения соответствует длине волны ~ 2 мм [6].

В настоящее время данное излучение рассматривается специалистами в области теоретической физики и космологии как следствие «Большого взрыва» Вселенной. Считается, что это излучение представляет собой электромагнитные волны, которые находились в термодинамическом равновесии с горячей космической плазмой. Однако только собственное, непрерывно генерируемое, излучение материального континуума может обеспечить столь высокую плотность энергии, изотропность и равномерность распределения данного вида излучения в пространстве Метагалактики. Ранее эта точка зрения была высказана авторами работы [14].

Учитывая расчетные данные, полученные на основе пространственно-электромагнитной модели, будем считать данную точку зрения обоснованной.

Поскольку размер фундаментального осциллятора иерархического уровня $i = 4$ находится в диапазоне, характерном для размеров живых структур, то генерируемое этим осциллятором электромагнитное излучение должно быть биологически активным. Этот вывод основан на том, что образование и эволюция живых организмов происходило и происходит в условиях постоянного и непрерывного воздействия природного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона. Воздействие этого излучения и взаимосвязь с ним должны быть отражены в эволюционном развитии организмов. Как следствие, излучение миллиметрового диапазона и создаваемое им волновое поле должны принципиально влиять на гомеостаз живых структур.

Данное предсказание также находит экспериментальное подтверждение. Обширный экспериментальный материал показывает, что электромагнитное излучение миллиметрового диапазона обладает ярко выраженным биологическим действием и способно принципиально влиять на жизненные процессы, оказывая первичное воздействие на субклеточном и клеточном уровне [17-17]. К воздействию электромагнитного миллиметрового излучения восприимчивы ключевые системы гомеостаза человека – система крови, клетки мозга, клетки иммунной системы. Электромагнитное миллиметровое излучение влияет на показатели системы свертывания крови, поглощение йода тиреоидной тканью, скорость регенерации поврежденных тканей. Обширный клинический и экспериментальный материал свидетельствует об изменениях иммунного статуса человека и животных после воздействия электромагнитного излучения миллиметрового диапазона. Резонансная зависимость выявленных эффектов указывает на специфическую особенность взаимодействия живых систем с электромагнитным излучением миллиметрового диапазона.

Таким образом, полученное на основе пространственно-электромагнитной модели физико-математическое доказательство иерархической индивидуальности живых структур согласуется с наблюдательными и экспериментальными данными.

3. Фундаментальное биологическое взаимодействие.

Поставим вопрос о существовании силового взаимодействия, характерного для биологической формы движения материи.

В работе [2] представлен вывод уравнения, связывающего силовые параметры взаимодействий объектов фундаментальных иерархических структур с характеристическими параметрами (свойствами) физического вакуума. Уравнение имеет вид (в логарифмической форме):

$$\log F_i = \log F_{abc} + f_R^i \cdot \log k_0, \quad (2)$$

где F_{abc} и F_i – параметры, имеющие размерность силы; $k_0 = 1/K_0$.

Уравнение (2) описывает последовательность фундаментальных взаимодействий: субнуклонное ($i = 1$); сильное или ядерное ($i = 2$); электромагнитное ($i = 3$); слабое ($i = 4$); гравитационное ($i = 5$) и позволяет определить их относительную интенсивность.

Сопоставление уравнений (1) и (2) и анализ полученных расчетных данных позволяют сделать вывод о существовании фундаментального силового взаимодействия, специфичного для иерархии живых структур.

Так, согласно уравнению (1), описывающему взаимосвязь фундаментальных иерархических структур, значению $i = 4$ соответствует иерархический уровень, включающий материальные объекты, имеющие размер, характерный для живых структур.

Согласно уравнению (2), описывающему взаимосвязь фундаментальных силовых взаимодействий, значению $i = 4$ соответствует фундаментальное слабое взаимодействие.

Учитывая расчетные характеристики фундаментального осциллятора иерархического уровня $i = 4$, и экспериментально установленный факт высокой биологической активности миллиметровых волн, можно заключить, что силовое взаимодействие, соответствующее иерархическому уровню $i = 4$, имеет прямое отношение к функционированию живых структур и его следует рассматривать как фундаментальное биологическое взаимодействие [3, 18].

Выводы.

Рассмотрение генезиса представления о времени и его свойств показывает, что время не существует само по себе, в отрыве от движения, и его нельзя рассматривать в качестве активного действующего начала. В отличие от пространства (протяженности), которое является первичным свойством материи и фундаментальным свойством физического мира, время является внешней характеристикой движения. По этой причине его нельзя рассматривать как свойство материи. Вследствие этого, объединение пространства и времени в единую конструкцию, претендующую на отображение природы материального континуума, неправомерно как с логической, так и с физической точки зрения. Используемая в современной теоретической физике и космологии рабочая модель материального континуума «четырёхмерное пространство-время» является математической конструкцией, имеющей весьма отдаленное отношение к действительности.

Для построения непротиворечивой модели материального континуума необходимо определить реально существующее фундаментальное свойство материи (отличное от времени, не являющееся таковым свойством), которое в органическом единстве с пространством составляет структурную основу материального континуума и источник самодвижения материи.

Такое фундаментальное свойство существует и проявляется в формах таких явлений, как электрический заряд, электрическое и магнитное поле, электромагнитные волны. Эти явления, в том или ином виде, проявляются в каждом объекте и процессе физического мира. Данное свойство, с учетом характера и особенностей его проявления, предложено называть «электромагнитным свойством» материи.

Новая рабочая модель материального континуума получила название пространственно-электромагнитной. В рамках данной модели пространство (протяженность) и электромагнитное свойство материи рассматриваются как ее первичные фундаментальные свойства, которые в органическом единстве и взаимодействии друг с другом составляют структурную основу материального континуума и источник самодвижения материи. Физический вакуум является материальной субстанцией, взаимосвязан с веществом и образует с ним единую систему.

На основе новой модели выведены уравнения, связывающие пространственные параметры фундаментальных иерархических структур и силовые параметры фундаментальных взаимодействий со свойствами физического вакуума. Анализ этих уравнений и полученные расчетные данные обосновывают иерархическую индивидуальность структур, относящихся к биологической форме движения материи. Полученный результат можно рассматривать как физико-математическое доказательство иерархической индивидуальности живых форм материи.

Пространственно-электромагнитная модель положена в основу научной концепции, согласно которой в природе существует фундаментальное биологическое взаимодействие, влияющее на гомеостаз живых структур. Тезис о существовании фундаментального биологического взаимодействия меняет сложившиеся представления о происхождении и эволюции живых форм. Зарождение жизни не является случайным процессом и регулируется природными волновыми процессами. В природе существует определенный спектр излучений, благодаря которым при благоприятных физико-химических условиях среды может происходить качественный переход от химической к биологической форме материи с образованием первичных живых структур. Таким образом, раскрывается источник и движущая сила перехода от неживой материи к живой.

Список литературы / References:

1. Астафуров В.И. Построение функциональной зависимости, связывающей пространственные параметры фундаментальных иерархических структур со свойствами физического вакуума. *Ядерная физика и инжиниринг*, 2013, т. 4, № 8-9, с. 862-866. [Astafurov V.I. Construction of a functional relation between the spatial parameters of fundamental hierarchical structures and the properties of physical vacuum. *Yadernaya fizika i inzhiniring*, 2013, vol. 4, no. 9-10, pp. 862-866. (In Russ.)]
2. Астафурова М.В., Добрецов С.Л., Астафуров В.И. Пространственно-электромагнитная модель физического вакуума и ее приложения. *Труды XII междунар. конф. «Забабахинские научные чтения. ЗНЧ-2014»*, Снежинск, 2014. URL: <http://www.vniitf.ru/images/zst/2014/Trudi/Sec3/3-47.pdf> [Astafurova M.V., Dobretsov S.L., Astafurov V.I. Spatial-electromagnetic model of physical vacuum and its applications. *Proceedings of the 12th International Conference "Zababakhin scientific talks. ZST-2014"*, Snezhinsk, 2014. URL: <http://www.vniitf.ru/images/zst/2014/Trudi/Sec3/3-47.pdf> (In Russ.)]
3. Астафуров В.И. Фундаментальное биологическое взаимодействие, определяющее функционирование живых структур. *Доклады VI междунар. науч. конф. «Математическая биология и биоинформатика»*, Пушкино, 2016, с. 52-53. URL: <http://www.impb.ru/icmbb/docs/ICMBB16.pdf> [Astafurov V.I. Fundamental biological interaction, determining biological structures functioning. *Reports of the VI International Scientific Conference "Matematicheskaya biologiya i bioinformatika"*, Pushchino, 2016, pp. 52-53. URL: <http://www.impb.ru/icmbb/docs/ICMBB16.pdf> (In Russ.)]
4. Опарин А.И. *Жизнь, ее природа, происхождение и развитие*. М.: Наука, 1968, 173 с. [Oparin A.I. *Life, its nature, origin and development*. M.: Nauka, 1968, 173 p. (In Russ.)]
5. Семёнов С.Ю., Астафуров В.И., Маренный А.М. Логико-математическое обоснование иерархической индивидуальности живых структур. *Новые идеи в философии*, 2019, вып. 6 (27), с. 240-251. [Semenov S.Yu., Astafurov V.I., Marennyy A.M. Logical-mathematical justification of the hierarchical individuality of living structures. *Novyye idei v filosofii*, 2019, vol. 6 (27), pp. 240-251. (In Russ.)]
6. Архангельская И.В., Розенталь И.Л., Чернин А.Д. *Космология и физический вакуум*. М.: КомКнига, 2006, с. 30-37. [Arkhangelskaya I.V., Rosenthal I.L., Chernin A.D. *Cosmology and physical vacuum*. M.: KomKniga, 2006, pp. 30-37. (In Russ.)]
7. Ленин В.И. *Материализм и эмпириокритицизм. Полн. собр. соч., т. 18*. М.: Политиздат, 1968, 181 с. [Lenin V.I. *Materialism and Empirio-Criticism. Full. Coll. Works., vol. 18*. M.: Politizdat, 1968, 181 p. (In Russ.)]
8. Минковский Г. *Пространство и время*. Новые идеи в математике. Сб. № 5. Принцип относительности в математике. СПб.: «Образование», 1914, 174 с. [Minkowski G. *Space and time*. New ideas in mathematics. Collection number 5. The principle of relativity in mathematics. SPb.: «Obrazovaniye», 1914, 174 p. (In Russ.)]
9. Фридман А.А. *Мир как пространство и время*. М.: Изд-во «ЛКИ», 2007, 112 с. [Friedman A.A. *World as space and time*. M.: LKI, 2007, 112 p. (In Russ.)]
10. Эйнштейн А., Инфельд Л. *Эволюция физики*, пер. с англ. изд. 1938 г. М.: ОГИЗ, 1948, 268 с. [Einstein A., Infeld L. *Evolution of physics* / translated from English ed. 1938. M.: OGIZ, 1948, 268 p. (In Russ.)]
11. Аристотель. *Физика*. М.: Соцгиз, 1936, с. 78-79. [Aristotle. *Physics*. M.: Sotsegiz, 1936, pp. 78-79. (In Russ.)]

12. Георгиева М.И. О физической реальности пространственно-временного континуума. *Труды Всерос. астроном. конф. «ВАК-2007»*. Казань: Изд-во КГУ, 2007, с. 416-418. [Georgieva M.I. On the physical reality of the space-time continuum. *Trudy Vserossiyskoy astronomicheskoy konf. «VAK-2007»*, Kazan', 2007, pp. 416-418. (In Russ.)]
13. Астафурова М.В. О существовании фундаментального свойства физического мира, отличного от пространства и времени. *Новые идеи в философии*. 2014, вып. 1 (22) в 2-х томах, т. 2. Пермь: Изд-во Перм. гос. нац. иссл. ун-та, 2014, с. 164-172. [Astafurova M.V. On the existence of a fundamental property of the physical world, different from space and time. *Novyye idei v filosofii*, 2014, iss. 1 (22), vol. 2, Perm', 2014, pp. 164-172. (In Russ.)]
14. Астафуров В.И., Маренный А.М. О правомерности интерпретации природного излучения в области миллиметровых длин волн как «реликтового излучения». *Труды Всерос. астроном. конф. «ВАК-2007»*, Казань, 2007, с. 422-424. [Astafurov V.I., Marennyy A.M. On the correctness of the interpretation of natural radiation in the region of millimeter wavelengths as "relict radiation". *Trudy Vserossiyskoy astronomicheskoy konferentsii «VAK-2007»*, Kazan', 2007, pp. 422-424. (In Russ.)]
15. Залюбовская Н.П., Киселев Р.И. О влиянии радиоволн миллиметрового диапазона на организм человека и животных. *Гигиена и санитария*, 1978, № 8, с. 35-39. [Zalyubovskaya N.P., Kiselev R.I. On the influence of radio waves of millimeter range on the human body and animals. *Gigiyena i sanitariya*, 1978, no. 8, pp. 35-39. (In Russ.)]
16. *Миллиметровые волны в медицине и биологии*, под ред. акад. Н.Д. Девяткова. М.: ИРЭ АН СССР, 1989, 307 с. [Millimeter waves in medicine and biology, ed. by N.D. Devyatkov. Moscow: USSR Academy of Sciences, 1989, 307 p. (In Russ.)]
17. Бецкий О.В., Кислов В.В., Лебедева Н.Н. *Миллиметровые волны и живые системы*. М.: Сайнс-Пресс, 2004, 272 с. [Betsky O.V., Kislov V.V., Lebedeva N.N. *Millimeter waves and living systems*. M.: Sayns-Press, 2004, 272 p. (In Russ.)]
18. Астафуров В.И. Фундаментальное биологическое взаимодействие: определение иерархического статуса и оценка интенсивности. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, № 1, с. 76-80. [Astafurov V.I. Fundamental biological interaction: determination of hierarchical status and evaluation of intensity. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 76-80. (In Russ.)]

PHYSICAL AND MATHEMATICAL PROOF OF THE HIERARCHICAL INDIVIDUALITY OF LIVING STRUCTURES

Astafurova M.V.¹, Astafurov V.I.²

¹ National Research University Higher School of Economics
Myasnitskaya str., 20, Moscow, 101000, Russia; e-mail: astafurova.maria@mail.ru

² Scientific and technical center of radiation and chemical safety and hygiene
Moscow, Russia

Abstract. The article describes the main provisions of the space-electromagnetic model of the material continuum and gives its justification. This model and the resulting equations form the basis of a new scientific concept, according to which there is a fundamental biological interaction in nature. Physical and mathematical proof of hierarchical individuality of living forms of matter is obtained. The thesis of the existence of a fundamental biological interaction changes the existing ideas about the origin and evolution of living forms. The origin of life is not a random process and is regulated by natural wave processes. Under favorable physical and chemical conditions of the environment, there can be a qualitative transition from chemical to biological form of matter with the formation of primary living structures.

Key words: space-electromagnetic model, fundamental interactions, biological interaction, hierarchy of structures, living structures, wave processes, millimeter waves, origin of life.

ИЗМЕРЕНИЕ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ПЛОТНЫХ КУЛЬТУР БЕНТОСНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Железнова С.Н.¹, Малахов А.С.², Геворгиз Р.Г.¹

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

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r-gevorgiz@yandex.ru

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет

пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: mac89@mail.ru

Поступила в редакцию: 01.08.2019

Аннотация. В работе рассматриваются проблемы измерения спектров поглощения бентосных видов диатомовых водорослей. При измерениях спектров культур бентосных микроводорослей ошибкам, связанным с рассеиванием света, сопутствуют ошибки, связанные с оседанием клеток. Показано, что использование портативных спектрофотометров при ориентации оптического пути в вертикальном положении скорость оседания бентосных водорослей не влияет на измерение спектров поглощения в области ФАР. Сообщается о необходимости учитывать спектры флуоресценции культуры из-за наличия большой доли флуоресценции в красной области.

Ключевые слова: микроводоросли, бентосные диатомовые водоросли, диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium*

Спектральные характеристики культур микроводорослей являются ключевым параметром в исследованиях фотосинтеза, продукционных характеристик, при решении экологических задач, а также для разработки новых биотехнологий на основе микроводорослей [1-5]. Для измерения спектра поглощения растворов обычно используются стационарные спектрофотометры, которые позволяют получать результат измерений с высокой степенью точности. Поскольку клетки микроводорослей обладают чрезвычайной гетерогенностью при измерении спектров поглощения плотных культур существенную роль играет не только поглощение, но и рассеивание света [1]. Для исключения процессов, связанных с рассеиванием света суспензией клеток, используют спектрофотометры с интегрирующей сферой. Данные приборы достаточно дороги, поэтому не всегда доступны для исследователя. Среди альгологов, исследующих культуры микроводорослей наибольшую распространенность получили спектрофотометры без интегрирующей сферы, разработанные для не рассеивающих свет растворов. При измерении спектров поглощения культур микроводорослей на таких приборах рассеиванием света пренебрегают.

Особые трудности у исследователей возникают при измерении спектров поглощения бентосных видов микроводорослей [4]. Клетки бентосных микроводорослей характеризуются удельной плотностью большей единицы [4], поэтому достаточно быстро оседают на дно кюветы, в связи с чем при длительном измерении проб (0,5-5 мин) на спектрофотометре получают заведомо искаженные спектры поглощения. Таким образом, при измерениях спектров культур бентосных микроводорослей ошибкам, связанным с рассеиванием света сопутствуют ошибки, связанные с оседанием клеток. Наибольшие искажения спектров наблюдается для спектрофотометров, у которых луч света при измерении распространяется горизонтально, поэтому такие приборы для исследований плотных бентосных культур практически непригодны.

В последнее десятилетие с развитием элементной базы появились портативные спектрофотометры, особенностью которых является возможность проводить измерения мощности и спектрального состава светового потока в любом направлении от источника излучения. Использование такого класса приборов позволяет проводить измерения с вертикальной ориентацией оптического пути, что исключает ошибки, связанные с оседанием клеток.

Цель работы – разработать методику измерения спектров поглощения плотных культур бентосных микроводорослей в области ФАР, используя портативный спектрофотометр.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали бентосную диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium*. Культуру, полученную из музея адаптировали к питательной среде RS на люминистате при постоянной температуре 15-18°C и круглосуточном освещении. Питательную среду готовили на основе стерильной черноморской воды. Адаптированную культуру использовали в качестве инокулята для накопительного и непрерывного культивирования *C. closterium* в плоскопараллельном фотобиореакторе с рабочим слоем 5 см. Культуру выращивали в интенсивном режиме при постоянной температуре $19 \pm 1^\circ\text{C}$, при круглосуточном освещении 13,25 клк белыми люминесцентными лампами СЕР11LF36W/54-765, спектральные характеристики которых представлены на рисунке 1. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (0,5 л воздуха на 1 л культуры в минуту) посредством компрессорной установки.

Измерение спектра ослабления культуры проводили непосредственно в фотобиореакторе, измеряя интенсивность светового потока и его спектральный состав, прошедшего сквозь культуру. Измерение проводили

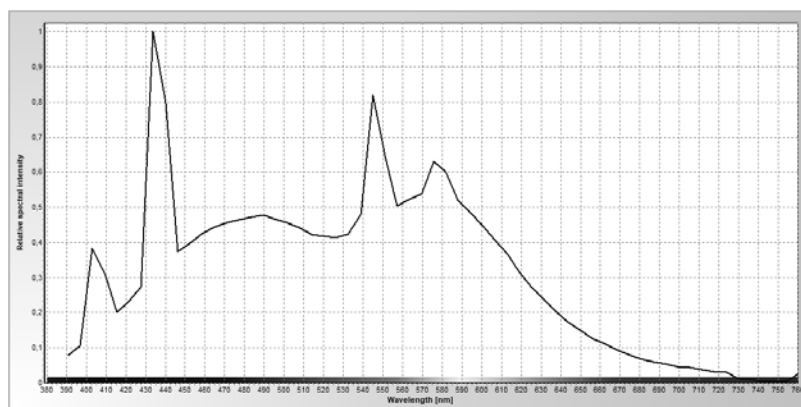


Рисунок 1. Спектр распределения энергии излучения люминесцентной лампы дневного света СЕ P1L 1 LF 36W/54-765, используемой для интенсивного культивирования *C. closterium*

с помощью регистрирующего спектрофотометра ТКА-Спектр(ФАР) при горизонтальном расположении оптического пути. Активный барботаж суспензии исключал оседание клеток на дно фотобиореактора, поэтому воспроизводимость измерений была достаточно высока.

Параллельно измеряли спектр ослабления культуры в химическом стеклянном стакане объемом 1 л с рабочим слоем суспензии 5 см при вертикальном расположении оптического пути. Для исключения процессов рассеяния света стенки стакана снаружи были покрыты титановыми белилами (коэффициент отражения 0,95-0,97).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В работе в использовали культуру бентосной диатомовой водоросли *C. closterium*, клетки которой без перемешивания оседают на дно достаточно быстро. В течение 0,5-1,5 мин коэффициент поглощения надосадочной жидкости близок к нулю, т.е. у *C. closterium* удельная плотность клеток заведомо больше единицы. Из-за оседания клеток спектры культуры на спектрофотометре с горизонтально расположенным оптическим путём получить практически невозможно. По нашим данным к концу измерений на таких спектрофотометрах как СФ2000 и Specord UV-VIS практически вся биомасса оседала на дно кюветы.

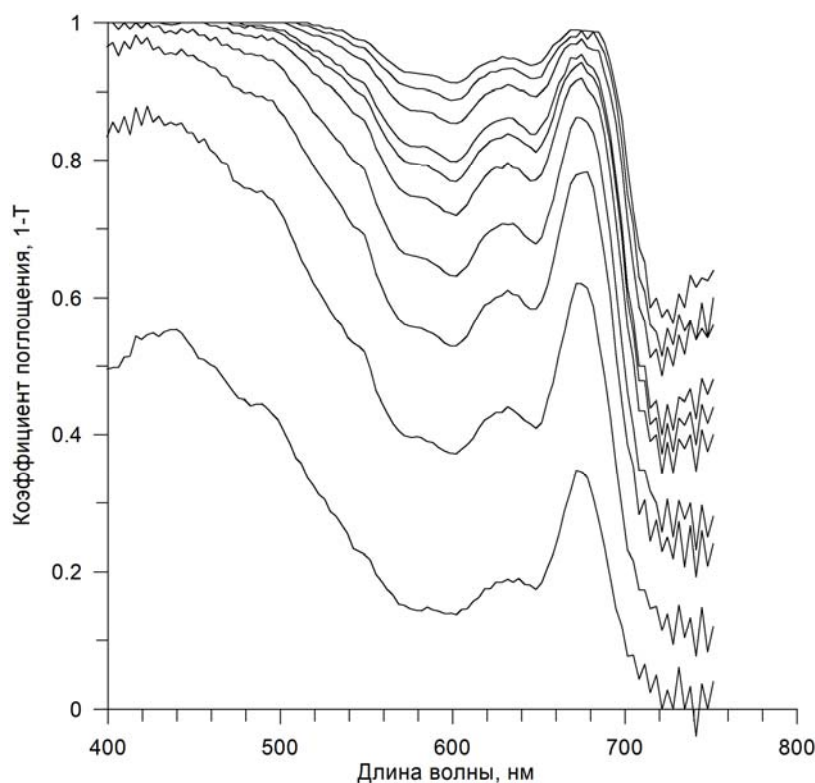


Рисунок 2. Спектр поглощения различных слоев (1-10 см) культуры *C. closterium* в химическом стакане с отражающими боковыми поверхностями при ориентации оптического пути вертикально

При вертикальном расположении оптического пути оседание клеток уже не оказывало существенного влияния на спектр культуры. Измерения спектров поглощения разных слоёв суспензии клеток *C. closterium* в химическом стакане с отражающими боковыми поверхностями представлены на рисунке 2.

Из рисунка 2 видно, что в области ФАР спектры получены без заметных искажений. За пределами 710 нм наблюдается значительный разброс данных, причиной которого, по-видимому, является интенсивная флюоресценция фотосинтетического аппарата. Таким образом, использование портативных спектрофотометров позволяет получать спектры культур бентосных видов микроводорослей.

Спектр поглощения культуры микроводорослей наиболее важен в расчетах КПД фотобиосинтеза. Обычно его получают с помощью стационарных спектрофотометров в кювете 1 см, но исследования, как правило, проводят в фотобиореакторах с рабочим слоем 2-10 см, в связи с чем поглощение рабочим слоем световой энергии экстраполируется на основе данных, полученных в 1 см кювете. Подобные расчеты неизбежно сопровождаются ошибками. В отличие от стационарных спектрофотометров портативные спектрофотометры позволяют получать спектры культур микроводорослей непосредственно при интенсивном культивировании клеток в фотобиореакторе. Для этой цели достаточно измерить световой поток, проходящий сквозь культуру. На рисунке 3 представлены спектры поглощения 5 см культуры *C. closterium*, полученные непосредственно в фотобиореакторе и в химическом стакане с отражающими боковыми поверхностями. Из рисунка 3 видно, что спектры достаточно близки. Небольшие различия можно объяснить рассеиванием света через боковые поверхности плоскопараллельного фотобиореактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектр поглощения культуры микроводорослей наиболее важен в расчетах КПД фотобиосинтеза и ошибки в измерениях спектров поглощения крайне недопустимы. Показаны существующие проблемы при измерении спектров поглощения плотных культур бентосных микроводорослей в области ФАР и предложены пути их решения.

Во-первых, при ориентации оптического пути в вертикальном положении скорость оседания бентосных водорослей перестает влиять на измерение спектров поглощения в области ФАР. Во-вторых, из-за большой доли флюоресценции культуры в красной области для точного анализа спектров поглощения необходимо учитывать спектры флюоресценции культуры.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ госрегистрации АААА-А18-118021350003-6) при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-34-00672.

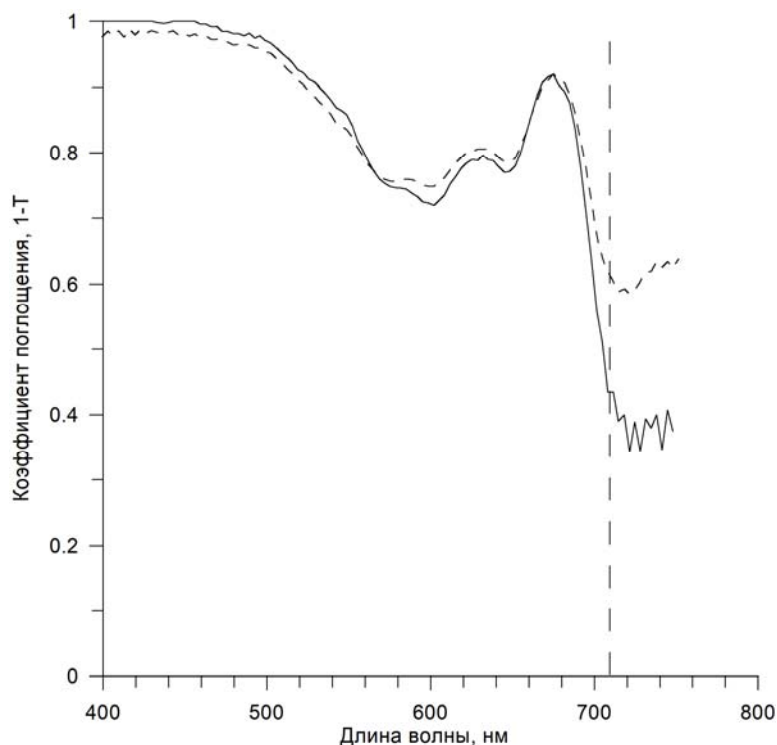


Рисунок 3. Спектр поглощения культуры *C. closterium*. Сплошная линия – поглощение 5 см суспензии в стакане с отражающими боковыми поверхностями. Оптический путь расположен вертикально. Пунктирная линия – поглощение суспензии в плоскопараллельном фотобиореакторе с рабочим слоем 5 см. Оптический путь расположен горизонтально

Список литературы / References:

1. Sánchez-Saavedra M.P., Voltolina D. Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas*, 2002, vol. 28, iss. 3, pp. 273-279.
2. Sánchez-Saavedra M.P., Voltolina D. Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 1996, vol. 8, iss.2, pp. 131-137.
3. Aida E., Gíanesellagalvao S.M.F., Sigaud T.C.S., Asano C.S., Liang T.H., Rezende K.R.V., Oishi M.K., Aranha F.J., Milani G.M., Sandes M.A.L. Effects of light quality on growth, biochemical composition and photosynthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) Butcher. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1994, vol. 180, iss 2, pp. 175-187.
4. Mercado J.M., Sanchez-Saavedra M.D., Correa-Reyes G., Lubian L., Montero O., Figueroa F.L. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany*, 2004, vol. 78, iss. 3, 265-277.
5. Mohsenpour S.F., Richards B., Willoughby N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology*, 2012, vol. 125, pp. 75-81. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.08.072.
6. Schellenberger Costa B., Jungandreas A., Jakob T., Weisheit W., Mittag M., Wilhelm C. Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 2013, vol. 64, iss. 2, pp. 483-493. DOI: 10.1093/jxb/ers340.

MEASUREMENT OF ABSORPTION SPECTRUM OF DENSE CULTURES OF BENTHIC MICROALGAE**Zheleznova S.N.¹, Malakhov A.S.², Gevorgiz R.G.¹**¹ A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS
Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru² National research Tomsk Polytechnic University
Lenin av., 30, Tomsk, 634050, Russia

Abstract. In this paper, the problems in measuring the absorption spectra of benthic diatom were considered. When measuring the spectra of cultures of benthic microalgae, there are errors associated with light scattering and associated with the subsidence of cells. It is shown that the use of portable spectrophotometers when orienting the optical path in a vertical position does not affect the measurement of absorption spectra in the PAR region. It is reported that it is necessary to take into account the fluorescence spectra of the culture due to the presence of a large proportion of fluorescence in the red region.

Key words: microalgae, benthic diatoms, diatom *Cylindrotheca closterium*.

МОДЕЛЬ РЕКОНСТРУКЦИИ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КРАСНОЙ ОБЛАСТИ *SPIRULINA PLATENSIS* IN VIVO ПО ХАРАКТЕРИСТИКАМ РАСТВОРОВ ХЛОРОФИЛЛА *a* И ФИКОБИЛИНОВ

Чернышев Д.Н.¹, Тренкеншу Р.П.²

¹ Севастопольский государственный университет

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

² ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию: 03.08.2019

Аннотация. В работе количественно описан спектр поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* микроводоросли *Spirulina platensis* тремя кривыми Гаусса в области от 550 до 700 нм. Полученная модель, с поправкой сдвига максимума поглощения, учитывающая упаковку пигмента в клетках, взята за основу для описания спектра поглощения нативной формы хлорофилла *a* в области 600-700 нм. Спектр водного экстракта фикобилинов также описывается гауссианой, но без поправок на упаковку. Используя суммарную модель можно описать красную область спектра поглощения культуры *S. platensis* и определить концентрации хлорофилла и фикобилинов по спектрам поглощения нативных культур.

Ключевые слова: спиролина, хлорофилл *a*, фикобилины, спектры поглощения, гауссианы.

ВВЕДЕНИЕ

Измерения концентрации пигментов в культурах микроводорослей представляет собой относительно сложную задачу как в теоретическом так в практическом плане. Как правило, в современных исследованиях используются методы, связанные с выделением пигментов из клеток путем их разрушения с дальнейшим экстрагированием. [1]. В подавляющем большинстве случаев оценка концентрации выделенных пигментов определяется спектрофотометрически.

В тоже время описаны способы определения пигментов в нативной культуре микроводорослей. Например, с хорошей точностью концентрация хлорофилла *a* коррелирует с красным максимумом поглощения в области длины волны 680 нм, измеренной, относительно 730-750 нм, ($\Delta D_{680} = D_{680} - D_{730}$) для хлореллы [2]. Такой же коэффициент, (сечение поглощения хлорофилла *a* был получен для морской микроводоросли *Platimonas viridis* [3]. Необходимо заметить, что измерения производились на двухлучевом спектрофотометре с интегрирующей сферой, которая обеспечила высокую точность измерения оптических характеристик и исключает фактор рассеяния света.

Вместе с тем, хорошо изучены оптические свойства пигментов, выделенных из клетки с помощью различных растворителей [4].

Оказалось, что спектры растворов пигментов имеют несколько максимумов, каждый из которых определяется наличием субъединиц (хромофорных групп). Эти группы имеют симметричную форму распределения, относительно максимума. Это позволило количественно описать зависимость поглощения от длины волны в виде суммы гауссиан или лоренциан. [5] По крайней мере для растворов хлорофиллов и каротиноидов [6]. При переходе к нативным формам пигментов максимумы сдвигаются. [7]

В предлагаемой работе сделана попытка количественно описать спектр поглощения культур микроводорослей и определить коэффициенты, позволяющие вычислить концентрации пигментов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования – спектры поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Spirulina platensis*.

Культуру *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl, из коллекции культур ИМБИ РАН, выращивали в культиваторах плоско-параллельного типа на среде «Zarrouk», в накопительном режиме, освещенность поверхности культиватора – 80 Вт/м², температура – 26-28°C. Культура постоянно снабжалась газо-воздушной смесью с 3% содержанием углекислого газа.

Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном (100%) [1]. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов и фиксировались на спектрофотометре Unico 4802, в диапазоне от 400 до 800 нм, в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Спектры нативных культур регистрировались на спектрофотометре Lambda 35 с интегрирующей сферой.

Для анализа спектров поглощения культуры и экстрактов *S. platensis* использовался метод разделения длинноволновой области спектра (от 600 до 700) на отдельные кривые Гаусса. Длинноволновая область спектра была разделена на 3 кривых Гаусса. Начальные параметры аппроксимации и количество кривых было задано исходя из анализа литературных данных [5, 8]

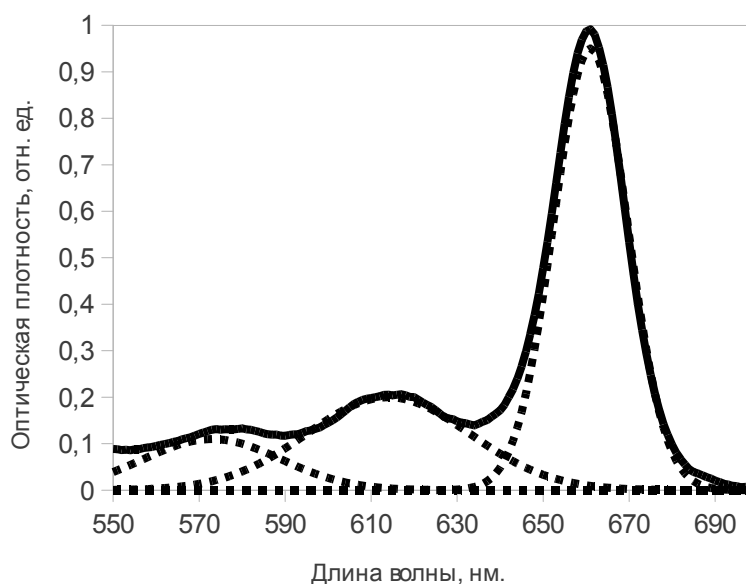


Рисунок 1. Разделение нормированного спектра поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* в области 550-700 нм

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Область спектра от 550 до 700 нм была выбрана для моделирования по нескольким причинам, а именно: спектральные характеристики хлорофилла *a* особенно велики, и в данной области каротиноиды не вносят значимый вклад в спектр поглощения [9].

Спектр ацетонового экстракта хлорофилла *a* *S. platensis*, нормированный в точке максимума 662 нм, был описан в области 550-700 нм тремя кривыми Гаусса (рис. 1).

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2},$$

где $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед.;

λ_i – длина волны, нм;

$\lambda_{\max}$ – положение максимума пика, нм;

$D_{\max}$ – амплитуда пика, отн. ед.;

σ – полуширина пика, нм.

Аппроксимация проводилась методом доверительных областей с заданными ограничениями и начальными параметрами. Коэффициент детерминации R^2 составил 0,998. Результаты аппроксимации приведены в таблице 1.

Основной проблемой при переходе от спектров растворов пигментов к измерению оптических характеристик нативных культур микроводорослей является то, что в клетке пигменты имеют гетерогенную структуру. Пигменты упакованы определенным образом, что приводит к изменению максимумов поглощения и, возможно, к изменению полуширины отдельных пиков, например, пики нативного хлорофилла *a* в области 550-730 нм сдвигаются на +12 нм [7]. Данные поправки были внесены в модель хлорофилла *a* в культуре. Известно, что смещение полосы поглощения хлорофилла не сопровождается изменением интенсивности и коэффициента экстинкции [10]. Поскольку в красной области спектра (550-750 нм) у синезеленых водорослей поглощение света происходит за счет фикобилиновых пигментов и хлорофилла *a*, необходимо учитывать

Таблица 1. Коэффициенты модели ацетонового экстракта хлорофилла *a*

Номер пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	568	16,0	0,11
2	617	20,6	0,20
3	661	8,6	0,95

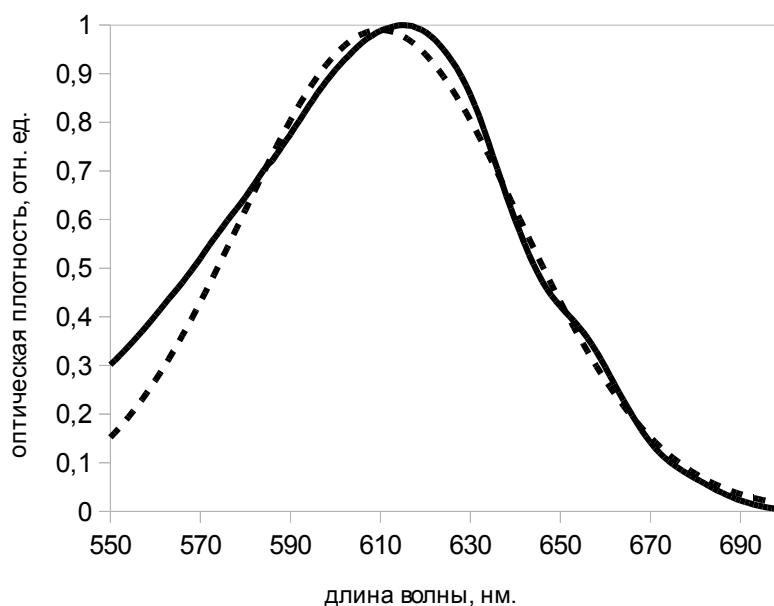


Рисунок 2. Спектр поглощения экстракта фикобилиновых пигментов и его модель

суммарные фикобилины. Экстракция фикобилиновых пигментов проведена по стандартной методике [11]. Была составлена простая модель для спектра данных пигментов, (нормировка 615), из одной кривой Гаусса (рис. 2).

Параметры модели приведены в таблице 2.

Принято считать, что в нативной форме максимум фикобилиновых пигментов не сдвигается. Полученную модель применена к нативному спектру (рис. 3).

Значения полученной модели нативного хлорофилла *a* приведены в таблице 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В приведенной работе предложена модель спектра поглощения нативных форм хлорофилла *a* и фикобилинов в культуре *S. platensis*. В модели достаточно использовать спектральные характеристики в интервале от 600 до 700 нм. Данная модель может использоваться для определения концентраций хлорофилла *a* и фикобилинов, используя непосредственно спектр поглощения культуры *in vivo*.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН» по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Таблица 2. Параметры модели спектра поглощения фикобилиновых пигментов

Номер пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	610	31	0,99

Таблица 3. Коэффициентов модели нативного хлорофилла *a*

Номер пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	586	23,6	0,11
2	635	30,4	0,20
3	679	12,7	0,95

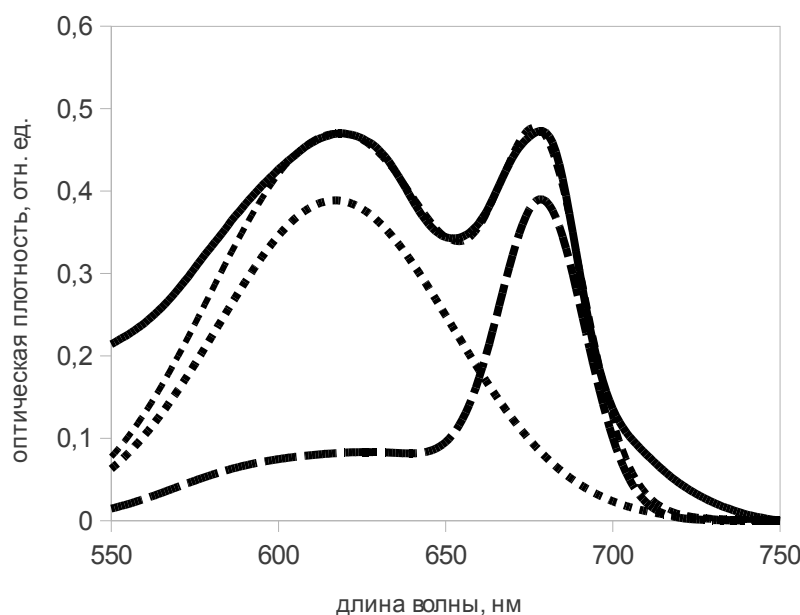


Рисунок 3. Спектр поглощения культуры *S. platensis* и его разделение на хлорофилл *a* (—) и суммарный спектр фикобилиновых пигментов (—·—)

Список литературы / References:

1. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015. [Kopytov Yu. P. et al. Method of complex determination of biochemical composition of microalgae. *Algology*, 2015. (In Russ.)]
2. Сидько Ф.Я., Беянин В.Н. Рост и эффективность фотосинтеза хлореллы при прерывистом облучении. *Доклады Академии наук СССР*, Изд-во Академии наук СССР, 1976, т. 230, №. 4-6, 998 с. [Sidko F. Ya., Belyanin V. N. Growth and efficiency of *Chlorella* photosynthesis under intermittent irradiation. *Reports of the USSR Academy of Sciences*, Publishing house of the USSR Academy of Sciences, 1976, vol. 230, no. 4-6, 998 p. (In Russ.)]
3. Тренкеншу Р.П., Беянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch., 1979. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. Influence of elements of mineral nutrition on productivity of algae *Platymonas viridis* Rouch., 1979. (In Russ.)]
4. Jeffrey S.W. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. *Phytoplankton pigments in oceanography*, 1997, pp. 449-559.
5. Küpper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analytical chemistry*, 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.
6. Чернышев Д.Н., Боровков А.Б. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта *Dunaliella salina*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, № 1-1, с. 51-56. [Chernyshev D.N., Borovkov A.B. Separation of absorption spectrum of acetone extract *Dunaliella salina*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, vol. 1 (1), pp. 51-56. (In Russ.)]
7. Bidigare R.R. et al. In-vivo absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X. – International Society for Optics and Photonics*, 1990, vol. 1302, pp. 290-303.
8. Парамонов Л.Е. Спектр показателей поглощения и внутриклеточная концентрация пигментов цианобактерий на примере *Spirulina platensis*. *Оптика атмосферы и океана*, 2018, т. 31, № 02, с. 103-108. [Paramonov L.E. Spectrum of indicators of absorption and intracellular concentration of cyanobacteria pigments on the example of *Spirulina platensis*. *Optika Atmosfery i Okeana*, 2018, vol. 31, no. 02, pp. 103-108. (In Russ.)]
9. Küpper H., Spiller M., Küpper F. C. Photometric method for the quantification of chlorophylls and their derivatives in complex mixtures: fitting with Gauss-Peak spectra. *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 286, no. 2, pp. 247-256.
10. Рабинович Е., Ильина А.А., Бояркина А.Н. *Фотосинтез*: Пер. с англ. – Иностранной литературы, 1953. [Rabinovich E., Ilyina A. A., boyarkina A. N. *Photosynthesis*: Per. s angl. – Inostrannoy literatuty, 1953. (In Russ.)]
11. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. Количественное определение массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Холодная экстракция: учебно-методическое пособие. РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского, Севастополь, 2017, 21 с. [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. Quantitative determination of the mass fraction of C-phycocyanin and allophycocyanin in the dry biomass of *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Cold extraction: educational and methodical manual. Russian Academy of Sciences, Institute of marine biological studies. A.O. Kovalevsky, Sevastopol, 2017, 21 p. (In Russ.)]

MODEL OF RECONSTRUCTION OF THE ABSORPTION SPECTRUM OF THE RED REGION *SPIRULINA PLATENSIS* IN VIVO BY CHARACTERISTICS OF CHLOROPHYLL *a* AND PHYCOBILIN SOLUTIONS**Chernyshev D.N.¹, Trenkenshu R.P.²**¹ Sevastopol state University*Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail:chernishevd@gmail.com*² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS*Nakhimov str., 2, Sevastopol, 299011, Russia*

Abstract. The article describes quantitatively the absorption spectrum of the acetone extract of chlorophyll and micro-algae *Spirulina platensis* by three Gauss curves in the range from 550 to 700 nm. The obtained model, with the correction of the absorption maximum shift, taking into account the pigment packing in the cells, is taken as a basis for the description of the absorption spectrum of the native form of chlorophyll *a* in the range of 600-700 nm. Spectrum of aqueous extract of phycobilins is also described as Gaussian, but with no adjustments for packing. Using the total model it is possible to describe the red region of the absorption spectrum of *S. platensis* culture and determine the concentration of chlorophyll and phycobilins by the absorption spectrum of native cultures.

Key words: *spirulina, chlorophyll a, phycobilins, absorption spectra, Gaussians.*

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ ВОДНОЙ ПРОВОДИМОСТИ В КОРНЯХ ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

Суслов М.А.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: makscom87@mail.ru
Поступила в редакцию: 09.08.2019

Аннотация. В данной работе представлен оригинальный методический и технический подход на базе низкочастотного спин-эхо ЯМР для неинвазивного и непрерывного исследования водного переноса в корнях интактных растений при действии повышенной концентрации CO_2 . Для реализации данного подхода была разработана и изготовлена портативная камера роста растений, имеющая возможность сопряжения с ЯМР установкой и газовой системой. Исследование интенсивности межклеточного водного переноса производилось на основе измерения коэффициента самодиффузии воды в тканях корня. Для этого был использован метод спин-эхо ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля. С помощью метода, представленного в данной работе, было показано, что водная проницаемость клеток в радиальном направлении всасывающей зоны корня уменьшается приблизительно в 1,5 раза при повышении уровня CO_2 до максимального значения в 1%. Впервые получена динамика изменения водной проводимости в корнях в зависимости от концентрации CO_2 , которая показывает, что величина и скорость снижения водного переноса возрастают с увеличением концентрации CO_2 . Предполагается, что трансмембранный путь переноса воды через аквапорины вносит значительный вклад в суммарное снижение межклеточной водной проводимости в тканях корня в ответ на повышение концентрации CO_2 .

Ключевые слова: углекислый газ, транспорт воды в корнях растений, ядерный магнитный резонанс.

Известно, что повышение концентрации углекислого газа в окружающей среде может оказывать положительное влияние на различные физиологические процессы в некоторых растениях [1, 2]. В частности, повышение концентрации CO_2 может приводить к увеличению скорости фотосинтеза, увеличению скорости роста корней и побегов растений, увеличению эффективности использования воды, а также к частичному нивелированию различных стрессовых воздействий, например, засухи, засоления почвы, дефицита питания [3-5]. В связи с этим, поиск механизмов увеличения продуктивности и устойчивости растений в ответ на повышение уровня CO_2 является перспективной задачей и не перестает вызывать интерес исследователей. В условиях антропогенного увеличения концентрации CO_2 в атмосфере Земли исследования в этой области приобретают ещё большую актуальность.

Подавляющая часть исследований реакции растений на повышение CO_2 посвящена физиологическим процессам, происходящим в наземной части растений, в основном в листьях, например, фотосинтез, устьичная проводимость, гидравлическая проводимость листьев [6]. При этом информация относительно реакции корневой системы, в частности, регуляции водной проводимости в корнях, особенно на клеточном и молекулярном уровнях, ограничена [5]. Растения поглощают воду и растворённые в ней питательные вещества с помощью корневой системы, а регуляция проводимости корней является одним из факторов эффективного использования воды и повышения продуктивности. Экспериментальные исследования последних лет показывают значительное влияние повышенной концентрации CO_2 на гидравлику растений и использование ими воды [7]. Очевидно, что перечисленные выше эффекты влияния повышенной концентрации CO_2 , в частности, увеличение эффективности использования воды и повышение устойчивости к водному стрессу, косвенно или напрямую связаны с регуляцией транспорта воды в корнях.

В большинстве исследований, в основном долгосрочных, было показано, что гидравлическая проводимость корней уменьшается в ответ на воздействие повышенного CO_2 . Это частично связывается с изменением структуры эндо- и экзодермиса корней, сопровождающимся накоплением суберина и увеличением сопротивления водному потоку [8]. В целом информация о влиянии повышенной концентрации CO_2 на водную проводимость в корнях растений ограничена [9, 10]. Остаётся много нерешённых вопросов относительно процесса регуляции водообмена в корнях растений в ответ на повышение концентрации CO_2 . В частности, отсутствуют данные о динамике изменения водного переноса в корнях. Неясно, какие изменения происходят в апопластном и трансклеточном путях водного переноса и в функциональной активности аквапоринов корней растений. Также отмечается важность и в то же время недостаток исследований о координации процессов, происходящих в листовой и корневой зонах растения в ответ на повышение концентрации CO_2 [7, 11].

Ограниченное количество исследований о реакции системы транспорта воды в корнях растений в ответ на повышение концентрации углекислого газа, связано, прежде всего, с экспериментальными сложностями их реализации, тем более в условиях *in vivo*. На сегодняшний день самый распространённый метод исследования водного переноса в корнях основан на измерении интегрального коэффициента гидравлической проводимости [8]. Для этого проводится процедура отсечения корня и затем, с помощью камеры давления или прижимного

аппарата, к корневой системе прикладывается избыточное давление и производится сбор корневого экссудата из места среза [8, 12, 13]. Похожий способ, но без отсечения всего корня, а лишь нижнего бокового ответвления от стебля, использован в работе [14]. Несмотря на популярность, данный метод обладает рядом ограничений и недостатков. Во-первых, процедура отсечения корня приводит к нарушению целостности растения. При этом следует обратить внимание на то, что раневой стресс в отдельности приводит к снижению интенсивности водного переноса в корнях [15, 16]. Во-вторых, применение данного метода, как самостоятельного, не позволяет разделить вклады различных путей водного переноса в корне, а также исследовать динамику изменения гидравлической проводимости при одновременном действии на растения нескольких различных факторов, в том числе повышенной концентрации CO_2 .

В настоящей работе представлен оригинальный методический и технический подход на базе низкочастотного ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля, позволяющий неинвазивно и непрерывно регистрировать параметры диффузионного транспорта воды и оценивать межклеточную водную проницаемость в корнях интактных растений непосредственно при контролируемом изменении концентрации углекислого газа в окружающей среде растений.

1. Камера роста растений, сопряжённая с ЯМР-диффузометром.

Для неинвазивного и непрерывного измерения ЯМР параметров водного переноса в корнях интактных растений непосредственно в условиях повышенной концентрации CO_2 было разработано и изготовлено две идентичные переносные камеры роста, имеющие возможность сопряжения с ЯМР установкой (рис. 1, а). Камеры имеют кубическую форму и объём 60 литров. Каждая камера состоит из двух отдельных частей – нижней пластины (основания), к которой крепится ампула с растениями и верхней части – купола. Первая камера (контрольная камера) предназначена для выращивания растений в условиях нормальной концентрации CO_2 ($\approx 0,04\%$), вторая камера – для выращивания при повышенных концентрациях CO_2 . Для исследования реакции системы транспорта воды в корнях растений в ответ на резкое повышение CO_2 вполне можно обойтись и одной камерой с одним образцом, однако для большей достоверности и качественного сравнительного анализа в долгосрочных экспериментах, необходимо иметь дополнительный контрольный образец. Для изготовления камер использовали оргстекло толщиной 6 мм. Камеры оснащены лампами освещения, цифровыми датчиками температуры, влажности, атмосферного давления (BME280, Bosch), концентрации CO_2 (MH-Z19B, WINSSEN), а также небольшими вентиляторами для перемешивания воздуха. Для поддержания нормального уровня CO_2 в контрольную камеру непрерывно поступал поток воздуха с концентрацией CO_2 0,04%. Вторая камера, с помощью тонкой 3мм пневмотрубки и системы последовательно соединённых электрического пневмоклапана и редуктора, подсоединялась к баллону с чистым углекислым газом. Углекислый газ дозированно подавали через штуцер в верхней части камеры. Стоит отметить, что камеры не были полностью герметизированы в целях избежания накопления этилена, ингибирующего рост растений. Считывание показаний датчиков и управление электроклапанами подачи CO_2 осуществляли с помощью аппаратно-программной платформы Arduino Uno R3. Во время проведения ЯМР экспериментов одну из камер устанавливали на специальную платформу на магните, при этом корневая зона растений помещалась в ЯМР зонд. По необходимости камеру с растениями можно перенести или заменить на другую камеру, например, контрольную.

В качестве образца использовали растения кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Пионер». Проростки кукурузы выращивали гидропонным способом в 0,25 мМ растворе CaCl_2 (pH = 7) при температуре 25°C в течение 5 дней при 12-часовом фотопериоде (освещенность 15 Вт м⁻²) и относительной влажности 60%. Затем сорок растений с длиной корня около 15 см размещали в две пробирки, изготовленные специально для ЯМР-зонда и для камер роста (по двадцать растений в каждой пробирке) (рис. 1, б, в). После этого пробирки с растениями помещали в камеры (рис. 1, б). В течение двух суток до начала ЯМР экспериментов растения выращивали в камерах при нормальной концентрации CO_2 (0,04%), относительной влажности 60% и температуре 25°C. Через капилляр в нижней части пробирки (рис. 1, в) осуществляли аэрацию корневой зоны с помощью аквариумного компрессора. Для орошения корней через этот же капилляр периодически добавляли раствор CaCl_2 (0,25 мМ, pH = 7). Зона ЯМР измерений находилась на расстоянии 8 см от верхнего конца пробирки, на 2,5 см выше верхнего уровня раствора CaCl_2 в пробирке.

2. ЯМР-диффузометрия

В данной работе исследование интенсивности межклеточного водного переноса основано на измерении коэффициента самодиффузии воды в тканях корня. Для этого использован метод спин-эхо ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля. Данный метод широко применяется для исследования транспорта воды в биологических образцах, в том числе в растительных тканях [15-18]. Его преимуществом является неинвазивность, а также возможность разделения вкладов различных путей водного переноса в растительных тканях [19, 20]. В течение ЯМР эксперимента, используя трёхимпульсную последовательность стимулированного эха [21], регистрировали диффузионные затухания (ДЗ) сигнала спин-эхо (рис. 2). ДЗ представляет зависимость амплитуды сигнала стимулированного спинного эха (R) от параметров импульсной последовательности: g – амплитуда импульсов градиента магнитного поля, t_d – время диффузии как интервал между импульсами градиента магнитного поля, δ – длительность градиентных импульсов. Эта зависимость выражается как:

$$R = \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 (t_d - \delta/3) D) \quad (1)$$

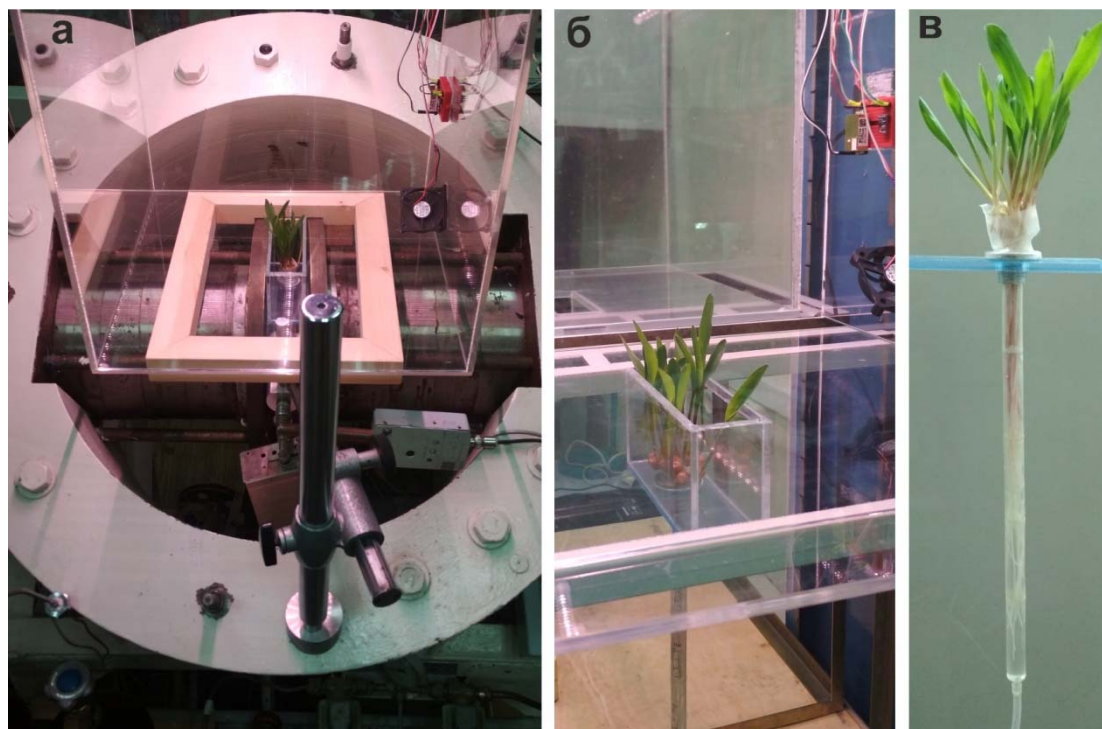


Рисунок 1. Техническая оснастка для неинвазивного исследования методом спинного эха ЯМР водного переноса в корнях интактных растений при действии повышенной концентрации углекислого газа: (а) – камера роста растений, установленная на ЯМР-диффузомер, готовая для проведения диффузионных измерений; (б) – фотография камеры роста с помещёнными в неё растениями кукурузы; (в) – пробирка с растениями, изготовленная специально под ЯМР-зонд и камеры роста

где R – относительная амплитуда сигнала спинного эха, которая равна отношению сигнала спин-эха в присутствии и отсутствии градиента магнитного поля $R = A(g)/A(0)$; γ – гиромагнитное отношение для протонов ($2.67 \cdot 10^8 \text{ Тл}^{-1}\text{с}^{-1}$); D – коэффициент само-диффузии воды. На графиках используется обобщённый параметр $b = \gamma^2 \delta^2 (t_d - \delta/3)$.

Известно, что зависимость коэффициента самодиффузии воды D от времени диффузии t_d в пористых системах, включая воду в биологических тканях, имеет S-образную форму с тремя характерными областями [16]: 1 – область свободной неограниченной диффузии большей части молекул воды, в которой коэффициент самодиффузии D_0 постоянен и близок к коэффициенту самодиффузии объёмной воды; 2 – область ограниченной диффузии, где усреднение локальных трансляционных движений молекул воды по большому объёму клеточного пространства не происходит; 3 – область затрудненной диффузии, которая характеризует межклеточную проницаемость. В этой области коэффициент самодиффузии воды D_∞ не зависит от t_d .

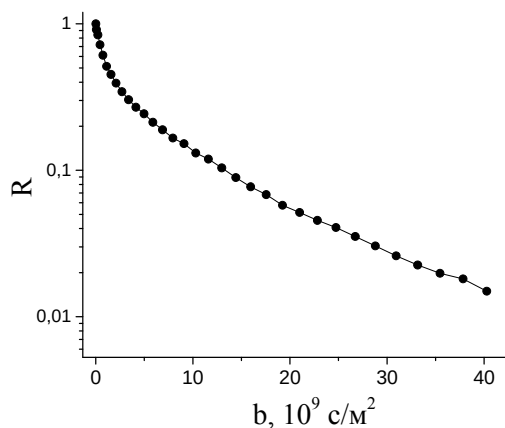


Рисунок 2. Диффузионное затухание амплитуды сигнала стимулированного спинного эха (R), полученное для радиального направления всасывающей зоны корней кукурузы в контрольных условиях при времени диффузии $t_d = 700 \text{ мс}$ и длительности градиентных импульсов $\delta = 400 \text{ мс}$

При длительном фиксированном времени t_d (например, 700 мс для корней кукурузы) межклеточные барьеры (мембраны и клеточные стенки) существенно ограничивают подвижность молекул воды в клетке, поскольку расстояния, пройденные молекулами, становятся сопоставимыми с размером клеток [15, 16]. В результате измеренное значение D меньше, чем D объемной воды. Поэтому для количественной оценки диффузионного переноса воды в образцах используется средний эффективный коэффициент диффузии воды D_{ef} [22]. D_{ef} определяется путём аппроксимации начального участка ДЗ уравнением (1) при $g \rightarrow 0$. Важно отметить, что при длительных временах диффузии t_d изменение D_{ef} напрямую коррелирует с изменением водопроницаемости межклеточных барьеров, которые ограничивают диффузионный процесс [22-24].

В ряде случаев для получения большего временного разрешения изменения D_{ef} , после регистрации полного ДЗ (рис. 1) дальнейшее измерение амплитуды сигнала спин-эха производится только при двух точках градиента магнитного поля, которые укладываются на начальный участок ДЗ, что также позволяет провести аппроксимацию начального участка ДЗ прямой линией и вычислить D_{ef} . Для контроля корректности измерения D_{ef} по двум точкам в конце опыта снова проводится измерение полного ДЗ. Таким образом, можно получить динамику изменения коэффициента само-диффузии воды с большим временным разрешением, что потенциально позволяет отслеживать быстрые изменения в водном переносе в корневой системе.

Для количественной оценки среднего эффективного коэффициента межклеточной водной проницаемости P использовалось уравнение Крика [23]. Это соотношение получено из расчёта сопротивления переносу воды через ряд параллельных проницаемых барьеров, разделенных расстоянием a (размер клеток) [16]:

$$\frac{1}{D_{\infty}} = \frac{1}{D_0} + \frac{1}{Pa} \quad (2)$$

Более подробно метод определения характеристических размеров ограничений a для молекул воды в тканях корня описан и применён в недавней работе [16]. Поскольку межклеточный перенос воды в тканях растений происходит по параллельным путям (трансмембранный путь, главным образом, через аквапорины, и симпластный путь – через плазмодесмы), уравнение (2) позволяет определить общую эффективную проницаемость цитоплазматической мембраны и плазмодесм.

ЯМР эксперименты проводили при температуре 25°C на ^1H ЯМР-диффузомере, оснащённом цифровым приёмно-передающим устройством «Spin Track» (Resonance Systems Ltd., Йошкар-Ола, Россия), работающем на частоте 19 МГц. ДЗ были получены с фиксированными значениями $t_d = 700$ мс и $\delta = 400$ мкс. Импульсный градиент магнитного поля прикладывали в радиальном направлении всасывающей зоны корня и, соответственно, самодиффузию воды наблюдали в этом направлении.

3. Оценка вклада аквапорин-опосредованного радиального межклеточного транспорта воды в корнях кукурузы в ответ на повышение концентрации CO_2 .

Хлорид ртути HgCl_2 – общепринятый специфический ингибитор аквапоринов. Он широко используется для оценки вклада аквапоринов в транспорт воды в растениях [25-27]. Чтобы ингибировать перенос воды через аквапорины, корни интактных растений кукурузы инкубировали в течение 20 минут в 200 мкМ растворе HgCl_2 непосредственно во время эксперимента ЯМР и без извлечения образца из зонда ЯМР. ЯМР-эксперименты с ингибированием аквапоринов проводили двумя способами. В первом случае повышенный уровень CO_2 применяли к растениям с корнями, предварительно инкубированными в растворе HgCl_2 . Перед воздействием CO_2 было проведено измерение D_{ef} для проверки ингибирующего влияния HgCl_2 на перенос воды. Во втором случае корни растений инкубировали после повышенного воздействия CO_2 .

4. Оценка реакции симпластного пути водного переноса в корнях на повышение уровня CO_2 .

Для выделения симпластного пути (через плазмодесмы) из общего межклеточного переноса воды в радиальном направлении корней использовали метод парамагнитного допинга, а в качестве парамагнитного комплекса диэтилен-триаминпентаацетат (Gd-DTPA) [28]. Gd-DTPA представляет собой парамагнитный комплекс с высокой релаксивностью, который позволяет повысить контрастность изображений и используется в магнитно-резонансной томографии [29]. При инкубации корней интактных растений в растворе Gd-DTPA парамагнитные ионы вводятся в межклеточное пространство, но не проникают в клетки. Внеклеточные молекулы воды испытывают быструю магнитную релаксацию благодаря контакту с парамагнитными ионами, что приводит к быстрому релаксационному затуханию сигнала от внеклеточной воды. В результате молекулы воды в апопласте становятся «невидимыми» и не вносят вклад в ДЗ, в то время как внутриклеточные молекулы воды, движущиеся по симпластной системе и все еще имеющие более длительное время релаксации, остаются «видимыми» в ДЗ [16, 28]. В настоящей работе использовали водный раствор комплекса Gd-DTPA в концентрации 0,01 М с $\text{pH} = 7$. Корни интактных растений инкубировали в растворе Gd-DTPA в течение 2 часов непосредственно в камере при нахождении корней в ЯМР зонде. По изменению формы ДЗ производится контроль проникновения парамагнетика во внеклеточное пространство [28]. После достижения нужного эффекта от парамагнетика в камеру подаётся углекислый газ до нужной концентрации и происходит дальнейшая регистрация ДЗ.

В качестве результатов применения описанного в работе метода на рисунке 3 представлена динамика изменения среднего эффективного коэффициента самодиффузии воды в корнях кукурузы при двух значениях концентрации CO_2 (0,5% и 0,1%). В обоих случаях происходит снижение интенсивности межклеточного водного переноса со временем, причиной которого, скорее всего, является снижение общего тока воды в растении в связи

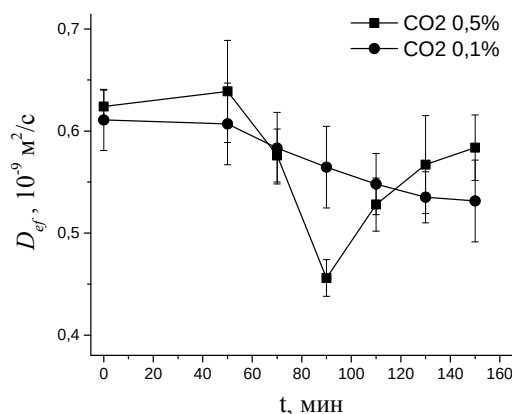


Рисунок 3. Динамика изменения среднего эффективного коэффициента самодиффузии воды во всасывающей зоне корней intactных растений кукурузы при повышении концентрации CO₂ в листовой зоне до 0,5 % и 0,1 %

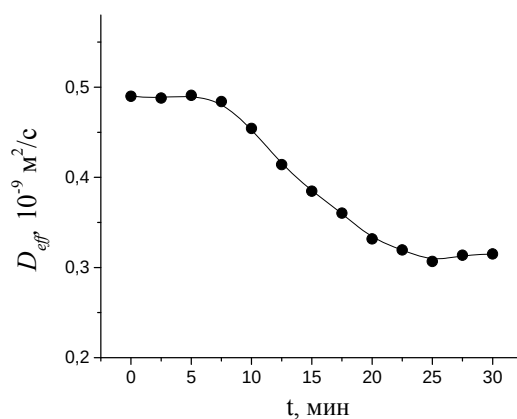


Рисунок 4. Динамика изменения среднего эффективного коэффициента самодиффузии воды во всасывающей зоне корней intactных растений кукурузы при повышении концентрации CO₂ в листовой зоне до 1 %

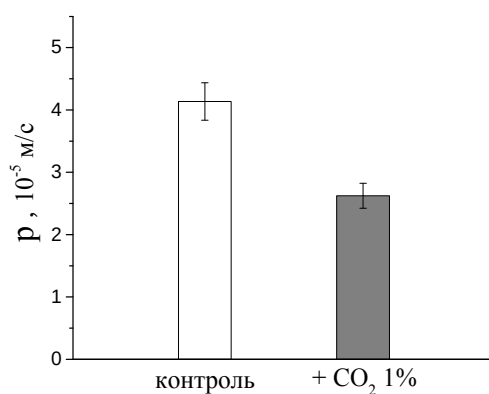


Рисунок 5. Суммарная межклеточная водная проницаемость в радиальном направлении всасывающей зоны корней intactных растений кукурузы в контроле (0,04% CO₂) и при повышении концентрации CO₂ в листовой зоне до 1 %

с уменьшением устьичной проводимости и транспирации. Полученные результаты согласуются с общепринятыми литературными данными о снижении гидравлической проводимости корней в ответ на повышение CO₂. На рисунке 4 отдельно представлена динамика изменения D_{eff} при максимальной концентрации CO₂ в 1% с временным разрешением в 2,5 минуты. В этом случае D_{eff} начинает снижаться уже через 5-7 минут после повышения CO₂ в камере и выходит на плато через 25-30 минут. По характеру кривых (рис. 3, 4) можно предположить, что амплитуда и скорость снижения D_{eff} зависит от концентрации углекислого газа. Интересно,

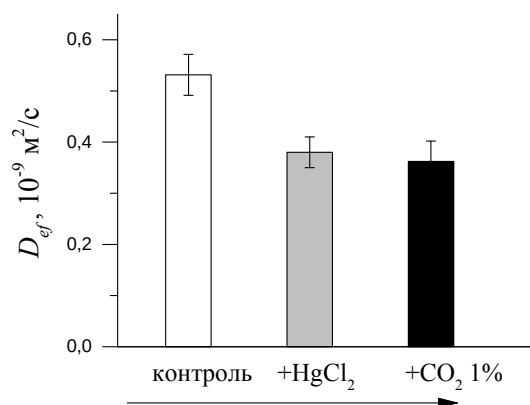


Рисунок 6. Средний эффективный коэффициент самодиффузии воды в клетках корней intactных растений кукурузы в контроле, после обработки этих же корней раствором хлорида ртути (HgCl₂ 200 мкМоль/л) и при последующем повышении концентрации CO₂ в листовой зоне до 1%

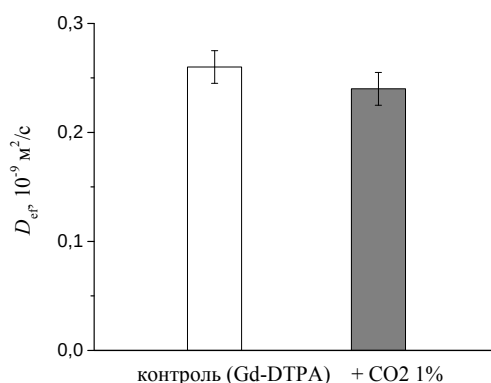


Рисунок 7. Влияние повышенной концентрации CO₂ на D_{ef} в корнях кукурузы с предварительно введённым во внеклеточное пространство корней парамагнитного комплекса Gd-DTPA

что при действии концентрации CO₂ в 0,5% через некоторое время наблюдается тенденция восстановления D_{ef} к значениям близким к начальным. Вычисленный коэффициент суммарной межклеточной водной проницаемости заметно снижается, приблизительно в 1,3-1,5 раза, при максимальной концентрации CO₂ в 1% (рис. 5).

После предварительной обработки корней ингибитором аквапоринов хлоридом ртути в концентрации 200 мкМоль/л повышение концентрации CO₂ не приводило к изменениям D_{ef} (рис. 6). Таким образом, ингибиторный анализ с использованием хлорида ртути, позволяет предположить, что значительный вклад в снижение суммарного межклеточного водообмена в корнях при повышении CO₂ вносит трансмембранный перенос воды через аквапорины. При этом не было зарегистрировано значительных изменений D_{ef} для симпластного переноса воды через плазмодесмы при действии CO₂ (рис. 7).

Таким образом, в данной работе продемонстрирован метод на базе низкочастотного ЯМР, позволяющий неинвазивно исследовать динамику водного переноса в корнях растений, а также оценивать вклад путей водного переноса, при непосредственном действии на растения повышенной концентрации CO₂. Полученные впервые результаты по динамике интенсивности водного переноса могут быть полезны в исследовании скорости развития ответной реакции растений на повышение концентрации CO₂. В качестве недостатков использования метода можно отметить обязательное наличие и относительную дороговизну ЯМР оборудования. Однако второе можно оптимизировать используя более дешёвые портативные ЯМР- диффузомеры-релаксометры. Технически данный метод можно применять для исследования транспорта воды в корнях растений при действии CO₂ в сочетании с другими абиотическими факторами внешней среды, например, водный дефицит, солевой стресс, изменение газового состава атмосферы. Это может значительно расширить список исследовательских задач и дать новую информацию при исследовании механизмов адаптации водного режима в растениях к абиотическим факторам, а также при исследовании корреляции водо- и газообмена.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00820 А.

Список литературы / References:

1. Qiao Y., Zhang H., Dong B., Shi Ch., Li Y., Zhai H., Liu M. Effects of elevated CO₂ concentration on growth and water use efficiency of winter wheat under two soil water regimes. *Agricultural Water Management*, 2010, vol. 97, pp. 1742-1748.
2. Prior S.A., Runion G.B., Marble S.Ch., Rogers H.H., Gilliam Ch.H., Torbert H.A. A review of elevated atmospheric CO₂ effects on plant growth and water relations: implications for horticulture. *Hort Science*, 2011, vol. 46, no. 2, pp. 158-162.
3. Jiang Y., Xu Z., Zhou G., Liu T. Elevated CO₂ can modify the response to a water status gradient in a steppe grass: from cell organelles to photosynthetic capacity to plant growth. *BMC Plant Biology*, 2016, vol. 16. DOI: 10.1186/s12870-016-0846-9.
4. Zaghdoud Ch., Mota-Cadenas C., Carvajal M., Muries B., Ferchichi A., Martínez-Ballesta M. Elevated CO₂ alleviates negative effects of salinity on broccoli (*Brassica oleracea* L. var *Italica*) plants by modulating water balance through aquaporins abundance. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, vol. 95, pp.15-24.
5. Huang B., Xu Y. Cellular and molecular mechanisms for elevated CO₂ regulation of plant growth and stress adaptation. *Crop Science*, 2015, vol. 55, pp. 1-20.
6. Domec J.-C., Palmroth S., Ward E., Maier Ch., Therezien M., Oren R. Acclimation of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance of *Pinus taeda* (loblolly pine) to long-term growth in elevated CO₂ (free-air CO₂ enrichment) and N-fertilization. *Plant, Cell and Environment*, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02014.x.
7. Hao Guang-You, Holbrook N.M., Zwieniecki M.A., Gutschick V.P., Bassiri-Rad H. Coordinated responses of plant hydraulic architecture with the reduction of stomatal conductance under elevated CO₂ concentration. *Tree Physiology* OO, 2018, pp. 1-12.
8. Sarker B.C., Hara M. Effects of elevated CO₂ and water stress on root structure and hydraulic conductance of *solanum melongena* l. *Bangladesh J. Bot.*, 2009, vol. 38, no. 1, pp. 55-63.
9. Leakey A.D.B., Ainsworth E.A., Bernacchi C.J., Rogers A., Long S.P., Ort D.R. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany*, 2009, vol. 60, pp. 2859-2876.
10. Calvo O.C., Franzaring J., Schmid I., Fangmeier A. Root exudation of carbohydrates and cations from barley in response to drought and elevated CO₂. *Plant and Soil*, 2019, vol. 438, pp. 127-142.
11. Easlon H.M., Bloom A.J. The effects of rising atmospheric carbon dioxide on shoot-root nitrogen and water signaling. *Frontiers in Plant Science*, 2013, vol. 4. DOI: 10.3389/fpls.2013.00304.
12. Gorska A., Ye Q., Holbrook N.M., Zwieniecki M.A. Nitrate control of root hydraulic properties in plants: translating local information to whole plant response. *Plant Physiology*, 2008, pp. 1159-1167.
13. Gebauer T., Bassiri-Rad H. Effects of high atmospheric CO₂ concentration on root hydraulic conductivity of conifers depend on species identity and inorganic nitrogen source. *Environmental Pollution*, 2011, vol. 159, pp. 3455-3461.
14. Stirzaker R.J., Passioura J.B. The water relations of the root-soil interface. *Plant, Cell and Environment*, 1996, vol. 19, pp. 201-208.
15. Velikanov G.A., Sibgatullin T.A., Belova L.P., Ionenko I.F. Membrane water permeability of maize root cells under two levels of oxidative stress. *Protoplasma*, 2015, vol. 252, pp. 1263-1273.
16. Anisimov A.V., Dautova N.R., Suslov M.A. Growth function and intercellular water transfer in excised roots. *Protoplasma*, 2019. DOI: 10.1007/s00709-019-01388-w.
17. Cho C.H., Hong Y.S., Kang K., Volkov V.I., Skirda V., Lee C.Y., Lee C.H. Water self-diffusion in *Chlorella* sp. studied by pulse field gradient NMR. *Magn Reson Imaging*, 2003, vol. 21, pp. 1009-1017.
18. Van As.H. Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol. 58, pp. 743-756.
19. Ishida N., Koizumi M., Kano H. The NMR microscope: a unique and promising tool for plant science. *Annual Botany*, 2000, vol. 86, pp. 259-278.
20. Anisimov A.V. Spin-echo NMR study of the translational water diffusion selectively along the apoplast and the cytoplasmic and vacuolar symplasts of plants. *Biophysics*, 2004, vol. 49, pp. 816-821.
21. Tanner J.E. Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies. *Journal of Chemical Physics*, 1970, vol. 52, pp. 2523-2526.
22. Anisimov A.V., Sorokina N.Y., Dautova N.R. Water diffusion in biological porous systems: a NMR approach. *Magn Reson Imaging*, 1998, vol. 16, pp. 565-568.
23. Crick F. Diffusion in embryogenesis. *Nature*, 1970, vol. 225, pp. 420-422.
24. Cooper R.L., Chang D.B., Young A.C., Martin C.J., Ancker-Johnson B. Restricted diffusion in biophysical systems. *Biophysical Journal*, 1974, vol. 14, pp. 161-177.
25. Javot H., Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake. *Annual Botany*, 2002, vol. 90, pp. 301-313.
26. Adiredjo A., Navaud O., Grieu Ph., Lamaze Th. Hydraulic conductivity and contribution of aquaporins to water uptake in roots of four sunflower genotypes. *Botanical Studies*, 2014, vol. 55. DOI: 10.1186/s40529-014-0075-1.
27. Sutka M., Li G., Boudet J., Boursiac Y., Doumas P., Maurel C. Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* grown in normal and salt-stressed conditions. *Plant Physiology*, 2011, vol. 155, pp. 1264-1276.
28. Anisimov A.V., Suslov M.A., Alyab'ev A.Yu. Symplasmic transport of water along the root depends on pressure. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 2014, vol. 61. DOI: 10.1134/S1021443714040025.

29. Carr D.H., Brown J., Bydder G.M., Steiner R.E., Weinmann H.J., Speck U., Hall A.S., Young I.R. Gadolinium-DTPA as a contrast agent in MRI: Initial clinical experience in 20 patients. *Am. J. Radiol.*, 1984, vol. 143, no. 2, pp. 215-224.

THE METHOD OF STUDYING THE DYNAMICS OF WATER CONDUCTIVITY IN THE ROOTS OF INTACT MAIZE PLANTS UNDER ELEVATED CONCENTRATION OF CARBON DIOXIDE

Suslov M.A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences
Lobachevskogo str., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru

Abstract. This work presents an original methodological and technical approach based on low-field spin-echo NMR for non-invasive and continuous study of water transfer in the roots of intact plants under impact of elevated concentration of carbon dioxide (CO₂). To realize this approach, portable plant growth chamber, that can be paired with an NMR system and a gas system, was made. The study of the intensity of intercellular water transfer was carried out on the basis of measuring of water self-diffusion coefficient in the root tissues. For this, the spin-echo NMR method with a pulsed magnetic field gradient was used. Using the method presented in the present work, it was shown that water permeability of cells in radial direction of root suction zone decreases by about 1.5 times with CO₂ enrichment to a maximum value of 1%. For the first time, the dynamics of changes in water conductivity in the roots depending on the concentration of CO₂ was obtained. It was shown that the magnitude and the rate of decreasing of water conductivity increase with CO₂ concentration enrichment. It is supposed, that transmembrane pathway of water transfer through aquaporins makes a significant contribution to the total decrease in the intercellular water conductivity in root tissues under elevated CO₂ concentration.

Key words: carbon dioxide, water transport in plant roots, nuclear magnetic resonance.

САМОАССОЦИАЦИЯ ФУЛЛЕРЕНА И ЕГО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ С ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ – ПЕРСПЕКТИВНОЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО

Мосунов А.А., Сало В.А., Воронин Д.П., Евстигнеев М.П.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 13.09.2019

Аннотация. Самоассоциация немодифицированного фуллерена C_{60} и его комплексообразование с химиотерапевтическими препаратами (в частности, доксорубицином, цисплатином и ландомицином А) в водном растворе рассматриваются как возможная ключевая стадия механизма биологической синергии *in vivo* и *in vitro*, наблюдаемой при совместном применении препаратов с фуллереном C_{60} . Выполнена полная характеристика водного раствора фуллерена, выдвинуты гипотезы о природе межмолекулярных сил, стабилизирующих конгломераты фуллерена. Проведена оценка размеров кластеров фуллерена, проведено сопоставление этого параметра с биологической активностью препарата и его комплексов с другими биологически активными соединениями. Впервые предложена математическая модель для расчета термодинамических параметров агрегации фуллерена. Проанализированы результаты применения различных физико-химических методов, позволяющих лучше понять природу сил, стабилизирующих комплексы фуллерена C_{60} с этими препаратами. Предложен физико-химический механизм, позволяющий, по крайней мере частично, объяснить биологическое взаимодействие препарата C_{60} .

Ключевые слова: фуллерен C_{60} , антибиотик, водный раствор, агрегация.

Фуллерены C_{60} интенсивно исследовались в последние десятилетия, главным образом, из-за широкого спектра их потенциальных применений в биомедицине [1, 2]. Благодаря своему нанометровому размеру немодифицированные фуллерены C_{60} способны взаимодействовать с биомолекулами и проникать через клеточную мембрану [3-5]. Они проявляют антиоксидантные свойства и, будучи нетоксичными (по крайней мере, в низких концентрациях) [6-10], оказывают специфическое воздействие на здоровье (например, подавляют рост злокачественных опухолей [11, 12]) и проявляют биологическую синергию с противоопухолевыми препаратами [13-15]. Хотя эти молекулы имеют чрезвычайно низкую растворимость в воде, они образуют стабильные коллоидные растворы, содержащие отдельные фуллерены C_{60} , а также агрегаты (кластеры) фуллерена C_{60} в воде при длительном перемешивании, обработке ультразвуком или замене растворителя [16, 17]. Чтобы понять поведение фуллерена C_{60} в биологической среде (на уровне клеток, тканей и органов) и его взаимодействие с лекарственными средствами, необходимо точно знать его концентрацию в воде (эффект дозы), распределение по размеру и форме (размерный эффект). Поскольку биомедицинские эффекты наночастиц фуллерена C_{60} напрямую зависят от этих свойств [18, 19], их знания позволят понять, «какая форма фуллерена C_{60} является биологически активной, а именно одна молекула или ее кластер?» И «как эта молекула взаимодействует» с другими препаратами в биологических средах?

В этой работе мы кратко рассмотрим последние достижения физико-химической характеристики немодифицированного фуллерена C_{60} и его взаимодействия с противоопухолевыми препаратами в водных растворах.

Исследования поведения немодифицированных частиц фуллерена C_{60} в водном растворе ведутся с конца 90-х годов, когда метод приготовления стабильных водных коллоидных растворов стал общедоступным [17, 20, 21]. К тому времени уже было известно много о свойствах фуллерена C_{60} в органических растворителях, что отчасти способствовало аналогичным исследованиям в водных растворах.

Исходя из определения, водные растворы любых фуллеренов C_{60} должны обладать свойствами коллоидных систем, которые содержат ассоциаты сольватированных фуллеренов C_{60} разного размера. Теоретический анализ возможных гидратированных кластеров $(C_{60})_N$ показал, что наименьший стабильный кластер фуллерена C_{60} (I_h группа симметрии) состоит из 13 молекул C_{60} [22, 23]. Его диаметр составляет 3,36 нм (с учетом молекулярного диаметра молекулы воды), что отлично согласуется с данными сканирующей туннельной микроскопии [24]. Дальнейший анализ показал, что диаметры кластеров регулярно увеличиваются в диапазоне от 3,4 до 36 нм, а именно: 3,4, 7,1, 10,9, 14,5, 18,1, 21,8, 25,4, 28,8, 32,4 и 36,0 нм [24], то есть каждая следующая частица больше предыдущей на 3,4-3,8 нм. Дальнейшее исследование водного раствора фуллерена C_{60} ($C_{60}FAS$) было разделено на характеристику структуры и морфологии кластеров и понимание механизма образования кластеров.

Различные физико-химические методы использовались для изучения специфики формирования кластеров фуллерена C_{60} . Характеризация частиц фуллерена C_{60} в водных растворах была выполнена с помощью УФ-видимой спектроскопии [22, 23, 25-28], электронной и туннельной микроскопии [25, 29-34], атомно-силовой микроскопии (AFM) [25, 35], дзета-потенциала [25, 31, 36, 37], динамического светорассеяния (DLS) [25, 29, 31-33, 38], Фурье инфракрасной/Рамановской спектроскопии [26-28, 34, 35], малоуглового рассеяния нейтронов (SANS) [16, 28, 35, 39] и некоторых других методов.

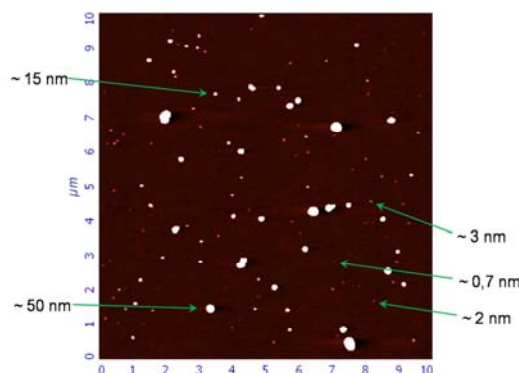


Рисунок 1. Пример экспериментально полученного методом атомно-силовой микроскопии изображения кластеров фуллерена C_{60}

УФ/видимая спектрофотометрия показала три широких полосы поглощения на длинах волн 208, 265 и 347 нм, которые характерны и для растворов фуллерена в органических растворителях [25, 26].

Состав C_{60} FAS обычно контролировался методами АСМ и туннельной/электронной микроскопии [25, 29-35]. Типичная картина АСМ приведена на рисунке 1; подобные картины были зарегистрированы в течение последних 10 лет различными исследовательскими группами. На рисунке показаны случайно расположенные отдельные молекулы C_{60} диаметром $\sim 0,7$ нм и их объемные сферические агрегаты высотой 2-50 нм. Интересно, что некоторые отдельные агрегаты фуллерена C_{60} с высотой ~ 100 нм были также зарегистрированы на изображениях с помощью зондовой микроскопии, что указывает на полидисперсную природу C_{60} FAS, включая мономеры или агрегаты, имеющие диаметры в диапазоне от нескольких до сотен нанометров.

Результаты микроскопических изображений также были подтверждены данными DLS и SANS [16, 25, 28, 29, 31-33, 35, 38, 39]. Широкое распределение гидродинамических размеров частиц фуллерена C_{60} по интенсивности со средним $z \sim 70$ -120 нм наиболее прямо свидетельствует о полидисперсности, независимо подтвержденной методом SANS. Экспериментальные данные указывают на то, что структурные и морфологические особенности полидисперсных агрегатов фуллерена C_{60} , присутствующих в водном растворе, остаются практически одинаковыми для различных методов получения C_{60} FAS [35].

Величина зета-потенциала, которая связана со стабильностью коллоидного распределения, охватывает относительно широкий диапазон от -9 мВ до -38 мВ [21, 25, 36, 37] и свидетельствует о наличии отрицательного заряда на поверхность молекулы C_{60} в растворе. Высокий отрицательный заряд коллоидных кластеров (или, точнее, электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными кластерами) играет важную роль в стабилизации C_{60} FAS (он ухудшает агрегацию и делает раствор электрически устойчивым).

Наличие отрицательного заряда на поверхности фуллерена C_{60} является общепринятым фактом и считается ключевым, но не единственным фактором растворимости фуллерена C_{60} в водном растворе. Фурье инфракрасный-спектр C_{60} FAS (рис. 2) отображает типичную картину пиков, которые можно было бы отнести к С-С колебательным модам молекулы C_{60} . Однако отмечено, что дополнительные пики не зависели от метода приготовления C_{60} FAS и соответствовали растяжению связей С-О. Это свидетельствует в пользу того, что фуллерен C_{60} является гидроксильрованным, а гидроксилы, образующие спиртовые функциональные группы, существуют в структуре фуллерена C_{60} в воде. Следовательно, основным механизмом сольubilизации фуллерена C_{60} в воде может быть присоединение ОН-групп к углеродам фуллерена C_{60} [34, 35].

Ковалентное присоединение ОН-групп не исключает возможности переноса электрона с молекул воды к фуллерену C_{60} , что позволяет объяснить отрицательный заряд частиц фуллерена C_{60} . Отсюда следует, что предыдущую модель стабилизации гидратированного фуллерена C_{60} молекулами воды, соединенными сеткой водородных связей [26, 28], необходимо пересмотреть с обязательным учетом имеющихся результатов молекулярно-динамического моделирования гидратированных фуллеренов C_{60} [40-43].

Недавно было установлено, что агрегаты немодифицированных фуллеренов C_{60} обеспечивают превосходную матрицу для образования высокоупорядоченных комплексов с включением других молекул, что приводит к усилению их физико-химических или биологических свойств [44, 45]. Помимо интереса к физико-химическому процессу агрегации, недавно было обнаружено, что токсичность фуллерена C_{60} *in vitro* коррелирует

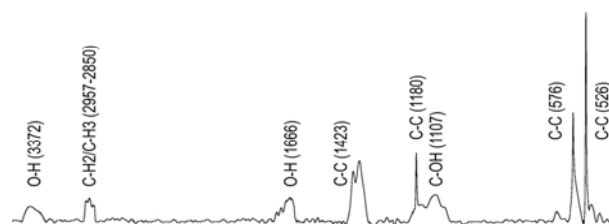


Рисунок 2. Пример экспериментально полученного фурье ИК-спектра фуллерена C_{60}

с его способностью подвергаться агрегации [46], и, в частности, агрегированные формы фуллерена C_{60} могут эффективно связываться с биополимерами [47]. Поэтому в настоящее время считается, что агрегация фуллерена C_{60} представляет общий интерес.

Определение термодинамических параметров агрегации, таких как равновесная константа агрегации или изменения энтальпии/энтропии/свободной энергии Гиббса, было выполнено всего в нескольких работах [40, 41, 48-50]. Возможные причины этого включают неполное понимание микроскопической картины образования кластера фуллерена C_{60} в растворе и, как следствие, трудности в построении теоретической модели агрегации фуллерена C_{60} . Например, было показано очень сложное взаимодействие ван-дер-ваальсовых, электростатических и гидрофобных взаимодействий при агрегации фуллерена C_{60} , которое, по-видимому, не следует классическому гидрофобному эффекту [40, 41, 51]. Это указывает на то, что общая термодинамическая картина агрегации фуллерена C_{60} в водном растворе отличается от классической агрегации малых молекул, что делает эту проблему все еще вакантной нишей для дальнейших исследований.

Предположительно, первая попытка измерить равновесную константу агрегации фуллерена C_{60} была осуществлена в [49] путем титрования водного раствора фуллерена C_{60} и регистрации усредненных по интенсивности распределений частиц, присутствующих в растворе, в эксперименте DLS. Эти данные позволяют рассчитать средний гидродинамический диаметр d_z (среднее значение z) и коэффициент поступательной диффузии D рассеивающих свет частиц.

В настоящее время принятая позиция по агрегации малых молекул в разбавленных водных растворах предполагает, что при увеличении концентрации растворенного вещества коэффициент трансляционной диффузии должен уменьшаться в результате увеличения размеров агрегатов [52, 53]. Качественно аналогичное представление существует и в отношении агрегации фуллерена C_{60} , что подтверждается теоретическим расчетом зависимости D от концентрации фуллерена C_{60} в толуоле [54].

Зависимость $d_z(C_0/r)$ на рисунке 3, полученная с использованием стандартных методов приготовления C_{60} FAS, демонстрирует обратное поведение: увеличение концентрации растворенного вещества приводит к уменьшению значения d_z . К сожалению, прямое сравнение этих результатов с существующими литературными данными не представляется возможным, поскольку эти статьи ограничены работой с измерениями D (или d_z) фуллерена C_{60} в растворе в одной точке концентрации в каждом случае (например, [31, 47]). Однако анализ литературных данных, связанных с агрегацией малых молекул, позволяет предположить, что при достижении мицеллярных концентраций зависимость от концентрации непосредственно измеренного коэффициента трансляционной диффузии (например, с помощью DLS или аналогичного действующего метода) становится обратной [54, 55]. Этот результат обычно интерпретируется с точки зрения прямого взаимодействия мицелл друг с другом в растворе из-за нековалентных сил, эффект, который был известен в течение некоторого времени [54, 55]. Мицеллярное взаимодействие действует как дополнение к броуновскому движению и, следовательно, приводит к повышению коэффициента диффузии при увеличении концентрации растворенного вещества. Принимая во внимание полидисперсную природу C_{60} FAS и существование кластеров фуллерена C_{60} с диаметрами в диапазоне величин от 10 до 100 нм, было высказано предположение, что обратная зависимость кривой $d_z(C_0/r)$ на рисунке 3 является следствием эффекта взаимодействия кластеров $(C_{60})_n$ [49].

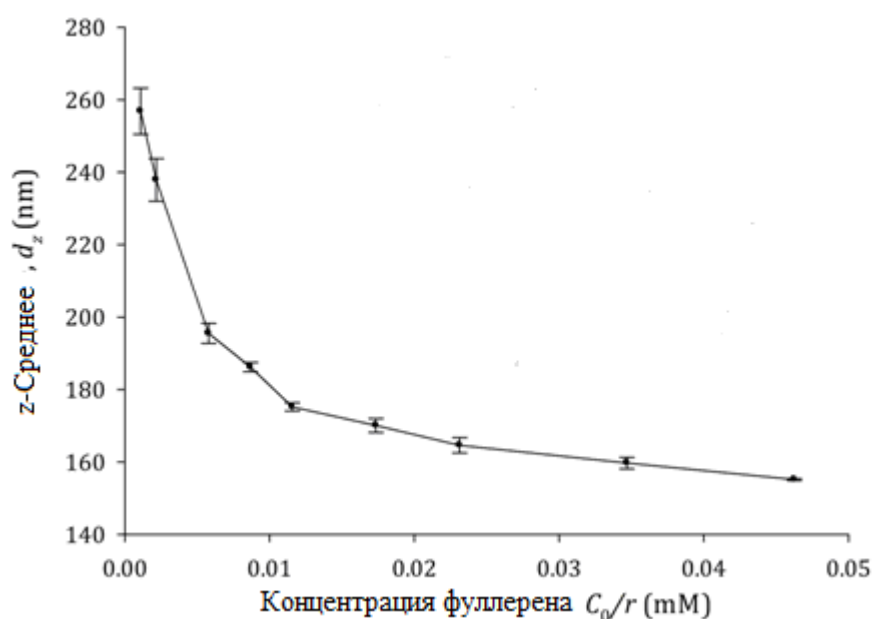


Рисунок 3. Экспериментальная зависимость среднего значения z от концентрации фуллерена C_{60}

Следовательно, форма кривой титрования на рисунке 3 определяется двумя противоположными тенденциями, а именно. агрегация, приводящая к увеличению dz , и взаимодействие кластеров, приводящее к уменьшению dz .

На основании эксперимента по титрованию DLS была предложена физическая модель агрегации фуллерена C_{60} [49] (так называемая «модель в увеличенном масштабе»). В соответствии с этой моделью агрегация происходит как одновременное связывание большого количества мелких частиц или мономеров фуллерена C_{60} (называемых «конгломератами») с большими кластерами фуллерена C_{60} (ядро кластера, которое считается не испытывающим диссоциации). В результате этого формируется равновесное распределение частиц фуллерена C_{60} по размерам, которое можно количественно определить в терминах равновесной константы агрегации K_F (или изменение свободной энергии Гиббса, ΔG_F). Полученное уравнение, позволяющее рассчитать экспериментальную кривую титрования на $d_z(C_0/r)$ рисунке 3, имеет вид [49]:

$$d_z = \frac{d_0}{1 + A' \frac{C'_{M0}}{r}} \cdot \frac{[1 + (B-1)BK_F C'_{R1}]^2 + B^3 K_F C'_{R1}}{(1 - BK_F C'_{R1})^3 \sum_{i=0}^{\infty} (1 + Bi)^{5/3} (BK_F C'_{R1})^i} \quad (1)$$

$$\text{где } C'_{R1} = \frac{r + C'_{M0}BK_F + (C_0 - C'_{M0})K_F - \sqrt{(r + C'_{M0}BK_F + (C_0 - C'_{M0})K_F)^2 - 4rK_F(C_0 - C'_{M0})}}{2rBK_F},$$

C'_{M0} , A' , K_F , B , d_0 параметры поиска, полученные путем подгонки экспериментальной кривой на рисунке 3 к уравнению (1).

Полученное значение константы агрегации равно $K_F = 56000 \text{ M}^{-1}$ [49], что хорошо согласуется с теоретически рассчитанным изменением свободной энергии Гиббса в [48].

Эксперимент по титрованию, рассмотренный выше и приведший к определению K_F , был дополнен оценкой энтальпии и изменения энтропии, связанных с процессом агрегации [50]. Прямое калориметрическое измерение теплового воздействия на разбавление и температурную зависимость z -среднего значения в эксперименте с DLS показало почти нулевое изменение энтальпии. Был сделан окончательный вывод о чисто энтропийном характере агрегации фуллерена C_{60} . Считается, что основной вклад в ΔG_F обусловлен гидрофобным взаимодействием, т.е. высвобождением молекул воды, слабо связанных с частицами фуллерена C_{60} , при образовании кластеров (то есть тех молекул, которые относятся к далеким гидратным оболочкам частицы фуллерена C_{60}). Важно, что в этом процессе первая гидратная оболочка, окружающая фуллерены C_{60} , остается практически неизменной, что приводит к тому, что контактное расстояние между поверхностями взаимодействующих частиц фуллерена C_{60} больше, чем наблюдается для типичного стэкинга ароматических молекул (около 0,5 нм). Теоретическое разложение ΔG_F на энергетические вклады от различных физических факторов показало, что чистые ван-дер-ваальсовы и электростатические термы оказываются относительно малыми из-за компенсаторного характера межмолекулярного взаимодействия и взаимодействия с растворителем при комплексообразовании [49], что дополнительно подтверждает энтропийная природа агрегации фуллерена C_{60} в водном растворе.

До настоящего времени возможность модификации биологических и/или физико-химических свойств фуллерена C_{60} или лекарственного средства рассматривалась главным образом путем ковалентного связывания молекул лекарственного средства с фуллереном C_{60} [44]. Как следствие, была синтезирована серия комплексов C_{60} с лекарственными средствами, обладающая улучшенными свойствами [56, 57]. С другой стороны, наличие в структуре молекулы C_{60} ароматической поверхности, состоящей из сопряженных углеродных колец, предполагает возможность ее эффективного взаимодействия посредством π -стэкинга с ароматическими фрагментами белков, оснований нуклеиновых кислот, ароматических витаминов, антибиотиков и др. соединения, которые могут присутствовать в биосистеме. Следовательно, нековалентное комплексообразование фуллеренов C_{60} с биорецепторами и ароматическими лекарственными средствами может в некоторой степени способствовать наблюдаемым биологическим эффектам на клеточном уровне и уровне организма. Косвенное обоснование этой гипотезы может исходить из хорошо известного факта, что некоторые клеточные эффекты воздействия ароматических биологически активных соединений можно интерпретировать с точки зрения их комплексообразования в физиологической среде [58]. За последние несколько лет появились два ряда сообщений, свидетельствующих о сильном биологическом взаимодействии *in vitro* и *in vivo* между фуллереном C_{60} и ароматическими противоопухолевыми препаратами, доксорубицином (Dox) [13-15, 59-61] и цисплатином (Cis) [62]. Особенностью этого взаимодействия было следующее: 1) наиболее выраженный эффект наблюдался при одновременном назначении лекарств и фуллерена C_{60} , 2) физико-химическое взаимодействие препарата с фуллереном C_{60} нековалентно, 3) отмечены предварительные показатели корреляции биологического эффекта *in vitro* с константой равновесия комплексообразования фуллерена C_{60} с ароматическими молекулами лекарственного средства [61]. Таким образом, знание того, как молекулы C_{60} взаимодействуют с ароматическими лекарственными средствами, важно для понимания механизма медико-биологического действия фуллеренов C_{60} .

Доступные в настоящее время данные о структуре и термодинамике взаимодействия между фуллеренами C_{60} и ароматическими молекулами недостаточны и ограничены системами, в основном изученными в неполярных растворах (см. работу [63] и ссылки в ней), и несколькими системами, изученными в водном

растворе. [13, 59, 62-67]. Ниже мы кратко рассмотрим основные результаты структурного и термодинамического анализа взаимодействия фуллерена C_{60} с Dox, Cis и новым ангуциклиновым антибиотиком ландомицином А (LA) [68] как системами, которые наиболее интенсивно исследованы на сегодняшний день по сравнению с другими.

Противоопухолевый антибиотик Dox относится к группе наиболее эффективных и широко применяемых препаратов при химиотерапии рака. Основным ограничением его использования является относительно высокая побочная токсичность, что создает давнюю проблему для поколений исследователей, пытающихся минимизировать этот недостаток. Как обсуждалось выше, было показано, что фуллерен C_{60} улучшает медико-биологический эффект Dox *in vivo* и *in vitro*, что делает комбинацию этих препаратов потенциально интересной для клинических исследований.

Обнаружение комплексообразования между фуллереном C_{60} и антибиотиком Dox проводилось различными физико-химическими методами [13, 59, 63, 65, 66]. Во всех этих исследованиях были получены противоречивые результаты. Так, АСМ-микроскопия в физиологических условиях и растворе с малой соленостью, гипохромный сдвиг в УФ-видимой спектроскопии, положительный сдвиг пика дзета-потенциала, изменение диффузного потенциала, измеренного методом DOSY ЯМР-спектроскопии, а также малоугловое рассеяние нейтронов показали образование комплексов между молекулами фуллерена C_{60} и Dox. В то же время, существует набор экспериментальных данных, свидетельствующих об отсутствии какого-либо комплексообразования между этими веществами. В частности, при высоких концентрациях фуллерена гипохромный сдвиг меняется гипсохромным в УФ-видимой спектроскопии, в калориметрических исследованиях изотермического титрования (показан почти нулевой тепловой эффект при смешивании растворов), кроме того, в ^1H ЯМР-эксперименте кривые титрования показали очень малый сдвиг [63, 65].

Наблюдаемое различие в результатах физико-химических методов, которые прямо свидетельствуют об образовании комплексов молекул, или, напротив, опровергают комплексообразование C_{60} -Dox, получили полную интерпретацию в [65]. Суть этого взгляда основана на двух основных утверждениях:

1) первая гидратирующая оболочка вокруг фуллеренов C_{60} не может быть отделена комплексом Dox, что приводит к большому расстоянию ($\sim 0,5$ Å) между поверхностями молекул Dox и C_{60} в комплексе. Как следствие, магнитное экранирование ^1H ЯМР может быть минимальным (что и показано в эксперименте), и энтальпийный вклад Ван-дер-Ваальсовых и электростатических сил может быть ослаблен (как показано в эксперименте ИТС). Следовательно, комплексообразование C_{60} -Dox, по-видимому, обусловлено энтропийным вкладом, то есть главным образом определяется гидрофобной силой вследствие удаления молекул воды из гидратных оболочек второго и более высокого уровня вокруг частиц фуллерена C_{60} ;

2) связывание молекул Dox при умеренных и высоких концентрациях фуллерена C_{60} в основном происходит посредством адсорбции в большие кластеры фуллерена C_{60} , что приводит к эффекту, называемому «индуцированная лигандом агрегация фуллерена C_{60} ». Вкратце, положительно заряженные молекулы Dox, поглощаемые отрицательно заряженными кластерами фуллерена C_{60} , вызывают дополнительный рост кластеров из-за ослабления электростатического отталкивания между молекулами C_{60} . Это вызывает дополнительное рассеяние света (как доказано в эксперименте УФ-видимой спектроскопии) и приводит к обратному самодиффузионному поведению молекул Dox (как показано в эксперименте DOSY ЯМР).

Физическая модель взаимодействия C_{60} -Dox, изложенная в этих двух утверждениях, позволила построить термодинамическую модель их взаимодействия и вычислить соответствующую равновесную константу гетероассоциации, $K_L \approx 6000 M^{-1}$ [63]. Она была в дальнейшем использована для корреляции относительного биологического эффекта воздействия смеси C_{60} -Dox на клетки буккального эпителия человека *in vitro* [61] и для сравнения сродства фуллеренового гетерокомплекса C_{60} с различными лекарственными средствами [63].

Водорастворимое неорганическое производное двухвалентной платины, известное как цисплатин (цис-[Pt(II)(NH₃)₂Cl₂]), в настоящее время является одним из наиболее широко используемых химиотерапевтических препаратов для лечения рака. Как и в случае с Dox, основным недостатком Cis является его побочная токсичность, ограничивающая его использование в клинической практике. Однако успех в улучшении медико-биологического эффекта Dox путем смешивания его с фуллереном C_{60} (см. Выше) привел к аналогичным исследованиям со смесью C_{60} -Cis, дающей положительный результат *in vivo* и *in vitro* [62].

Исследование возможного комплексообразования между фуллереном C_{60} и Cis было проведено с использованием протокола, аналогичного в целом рассмотренному выше для взаимодействия C_{60} -Dox [67]. Следует отметить, что прямое комплексообразование между молекулами C_{60} и Cis, вероятно, должно быть относительно слабым по сравнению с системой C_{60} -Dox, поскольку в первом случае π -стэкинг отсутствовал бы. Как и ожидалось, спектры УФ-видимой спектроскопии дали незначительные признаки взаимодействия, а ИТС продемонстрировал практически нулевой тепловой эффект. Напротив, функция распределения пар, полученная методами малоуглового рассеивания нейтронов (рис. 4) подтвердила существование двух видимых статистически различных компонентов в водном растворе, один из которых был отнесен к комплексам C_{60} -Cis.

Этот вывод был частично подтвержден исследованиями SEM и DLS (рис. 5). Последнее исследование показало очевидный сдвиг распределения гидродинамических радиусов светорассеивающих частиц в более высокие числа при добавлении цисплатина к водному раствору фуллерена C_{60} . Показано, что *ab initio* структура комплекса C_{60} -Cis характеризуется стабильным минимумом энергии.

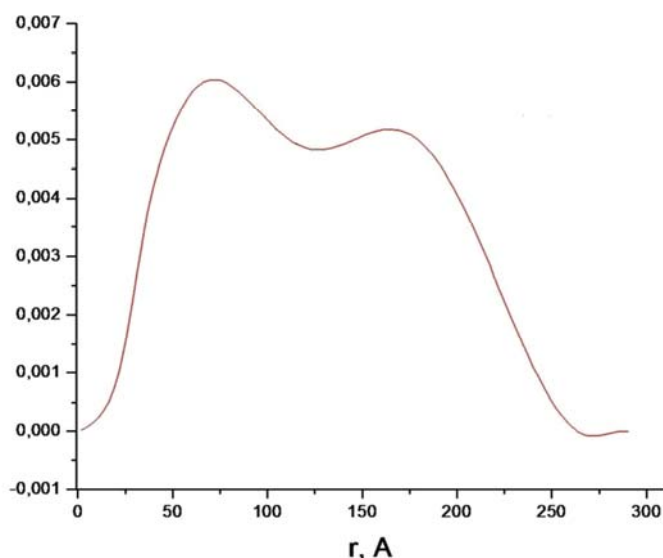


Рисунок 4. Экспериментально полученное значение размеров комплексов C_{60} -цисплатин, полученное методом малоуглового рассеяния нейтронов

В целом было обнаружено, что выявленные закономерности физико-химического взаимодействия фуллерена C_{60} с цисплатином во многом напоминают взаимодействие молекулы C_{60} с противоопухолевым антибиотиком Dox, рассмотренным выше. Комплексообразование Cis с фуллереном C_{60} является энтропийным по происхождению и полностью обусловлено гидрофобными взаимодействиями. Связывание цисплатина происходит в основном в большие кластеры фуллерена C_{60} посредством неспецифической адсорбции, хотя нельзя исключить существование слабых комплексов C_{60} -Cis размерности 1: 1.

Ландомицин А (ЛА) является новым противоопухолевым антибиотиком группы ангуциклинов, обладающим высокой противоопухолевой активностью в отношении раковых клеток различного происхождения, что вызывает ранний апоптоз в клетках-мишенях [69-72].

Данные DLS свидетельствуют о явном сдвиге среднего значения z при добавлении ЛА к C_{60} FAS. Однако наиболее интересным является сопутствующее изменение формы распределения светорассеивающих частиц, которое сужается и смещается в большие размеры. Это наблюдение означает, что раствор ЛА влияет на распределение кластеров фуллерена C_{60} и косвенно указывает на возможность взаимодействия между молекулами ЛА и C_{60} . Величина дзета-потенциала, измеренная для смеси C_{60} -ЛА, сместилась до -10 мВ от первоначального значения -22,1 мВ, измеренного для C_{60} FAS, дополнительно подтверждая возможность взаимодействия. И, наконец, эксперимент малоуглового рассеяния нейтронов также подтвердил изменение радиуса рассеяния в смеси C_{60} -ЛА.

Ландомицин А представляет собой ароматическое соединение, содержащее плоский хромофор бенз[ан]антрахинона. Как следствие, наиболее вероятное расположение молекул в комплексе C_{60} -ЛА 1:1 представляет собой структуру, удерживаемую π -стэкингом. Основной вклад в устойчивость такого комплекса дают взаимодействия между хромофором препарата и поверхностью фуллерена C_{60} , а роль дезоксиолигосахаридной цепи, по-видимому, незначительна.

Самоорганизация фуллерена C_{60} и его комплексообразование с химиотерапевтическими препаратами (в частности, доксорубицином (Dox), цисплатином (Cis) и ландомицином А (ЛА)) в водном растворе были

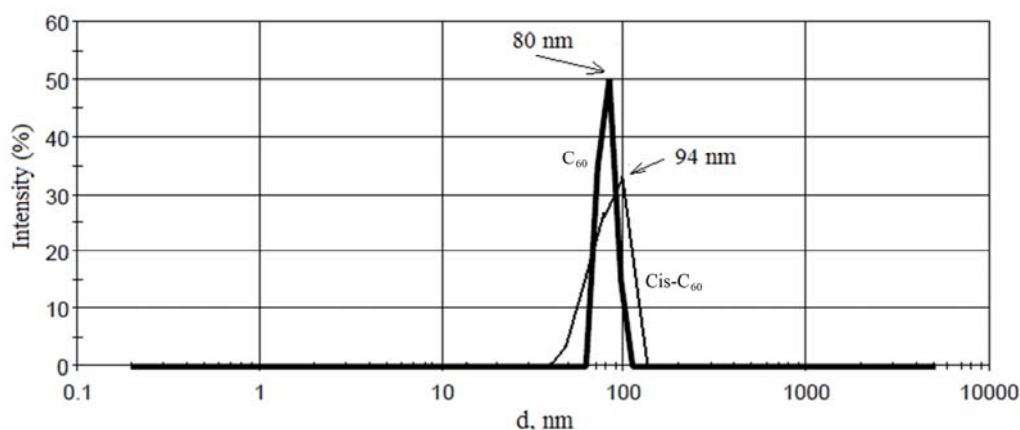


Рисунок 5. Спектр распределения гидродинамических радиусов светорассеивающих частиц

рассмотрены в этой работе как возможная ключевая стадия механизма биологического синергизма *in vivo* и *in vitro*, наблюдаемая, когда эти препараты вводятся совместно с фуллереном C₆₀. Хотя исследуемые препараты сильно различаются по химической структуре и свойствам, было обнаружено, что их термодинамические формы связывания с фуллереном C₆₀ в целом сходны. Помимо определенных особенностей связывания, было обнаружено, что комплексообразование, как правило, является неспецифическим, энтропийным по происхождению и происходящим в основном в большие кластеры фуллерена C₆₀. При этом ведущую роль в процессе играют гидрофобные взаимодействия. Этот физико-химический механизм может быть далее перенесен на биологическую систему, а именно при одновременном введении гидрофобные кластеры фуллерена C₆₀, включающие молекулы Cis, Dox или ЛА, защищают их от реакционной среды при движении в биологической жидкости. Следовательно, эти кластеры могут действовать как система доставки и повышать активную концентрацию лекарственного средства, которое вызывает биологический эффект. Такой механизм, по крайней мере, частично, объясняет биологическую синергию, наблюдаемую экспериментально для смесей C₆₀-Cis и C₆₀-Dox. По-видимому, это спекулятивная модель, которая требует дальнейшего изучения и может быть просто использована в качестве исходной гипотезы в дальнейших исследованиях биологических взаимодействий C₆₀-лекарственного средства. С другой стороны, использование фуллерена C₆₀ в качестве потенциальной системы доставки сейчас широко обсуждается в научной литературе (см. Обзор [44]). Таким образом, предложенная модель хорошо согласуется с механизмом захвата поверхностно-активных соединений кластерами фуллерена C₆₀ [73] и может, вероятно, пролить свет на механизм биологической синергии, наблюдаемой при одновременном введении фуллеренола с Dox [74], который до сих пор не получил объяснения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00157 «Агрегация фуллерена C₆₀ с биологически активными соединениями в водной среде как механизм индуцированной лигандами сборки фуллеренового наноконтейнера для адресной доставки лекарственных препаратов».

Список литературы / References:

1. *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes. Series: Carbon Materials: Chemistry and Physics.* F. Cataldo and T. Da Ros (Eds.), Springer, Netherlands, 2008.
2. Anilkumar P., Lu F., Cao L. et al. Fullerenes for applications in biology and medicine. *Current Med. Chem.*, 2011, vol. 18, p. 2045.
3. Turov V.V., Chehun V.F., Krupskaya T.V. et al. Effect of small addition of C₆₀ fullerenes on the hydrated properties of nanocomposites based on highly dispersed silica and DNA. *Chem. Phys. Lett.*, 2010, vol. 496, p. 152.
4. Foley S., Crowley C., Smaih M. et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 294, p. 116.
5. Prylutska S., Bilyy R., Overchuk M. et al. Water-soluble pristine fullerenes C₆₀ increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2012, vol. 8, p. 522.
6. Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevska O.P. et al. Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro*. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2008, vol. 16, p. 698.
7. Andrievsky G., Klochkov V., Derevyanchenko L. Is the C₆₀ fullerene molecule toxic?! *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2005, vol. 13, p. 363.
8. Levi N., Hantgan R., Lively M. et al. C₆₀-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects. *J. Nanobiotechnol.*, 2006, vol. 4, p. 14.
9. Prylutska S.V., Matyshevska O.P., Golub A.A. et al. Study of C₆₀ fullerenes and C₆₀-containing composites cytotoxicity *in vitro*. *Mater. Sci. Engineer C*, 2007, vol. 27, p. 1121.
10. Kolosnjaj J., Szwarc H., Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, vol. 620, p. 168.
11. Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutsky Yu.I. et al. Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp. Oncol.*, 2011, vol. 33, p. 162.
12. Prylutska S.V., Burlaka A.P., Klymenko P.P. et al. Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nanotechnol.*, 2011, vol. 2, p. 105.
13. Panchuk R.R., Prylutska S.V., Chumak V.V. et al. Application of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo*. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2015, vol. 11, p. 1139.
14. Prylutska S., Skivka L., Didenko G. et al. Complex of C₆₀ fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy. *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, vol. 10, p. 499.
15. Prylutska S.V., Korolovych V.F., Prylutsky Yu.I. et al. Tumor-inhibitory effect of C₆₀ fullerene complex with doxorubicin. *Nanomed. Nanobiol.*, 2015, vol. 2, p. 49.
16. Avdeev M.V., Khokhryakov A.A., Tropin T.V. et al. Structural features of molecular-colloidal solutions of C₆₀ fullerenes in water by small-angle neutron scattering. *Langmuir*, 2004, vol. 20, p. 4363.
17. Mchedlov-Petrosyan N.O. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry. *Chem. Rev.*, 2013, vol. 113, p. 5149.
18. Rud Yu., Buchatsky L., Prylutsky Yu. et al. Using C₆₀ fullerenes for photodynamic inactivation of mosquito iridescent viruses. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2012, vol. 27, p. 614.

19. Chen Z., Mao R., Liu Y. Fullerenes for cancer diagnosis and therapy: preparation, biological and clinical perspectives. *Curr. Drug Metabolism*, 2012, vol. 13, p. 1035.
20. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.H. et al. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, vol. 12, p. 1281.
21. Deguchi S., Alargova R.G., Tsujii K. Stable dispersions of fullerenes, C₆₀ and C₇₀, in water. Preparation and characterization. *Langmuir*, 2001, vol. 17, p. 6013.
22. Prylutsky Yu.I., Durov S.S., Bulavin L.A. et al. Structure and thermophysical properties of fullerene C₆₀ aqueous solutions. *Int. J. Thermophys.*, 2001, vol. 22, p. 943.
23. Bulavin L., Adamenko I., Prylutsky Y. et al. Structure of fullerene C₆₀ in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, vol. 2, p. 1627.
24. Andrievsky G.V., Klochov V.K., Karyakina E.L. et al. Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C₆₀ by electron microscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 1999, vol. 300, p. 392.
25. Ritter U., Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P. et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2015, vol. 23, p. 530.
26. Andrievsky G.V., Klochov V.K., Bordyuh A.B., Dovbeshko G.I. Comparative analysis of two aqueous-colloidal solutions of C₆₀ fullerene with help of FTIR reflectance and UV-Vis spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 2002, vol. 364, p. 8.
27. Prilutski Y., Durov S., Bulavin L. et al. Study of structure of colloidal particles of fullerenes in water solution. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1998, vol. 324, p. 65.
28. Scharff P., Risch K., Carta-Abelmann L. et al. Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data. *Carbon*, 2004, vol. 42, p. 1203.
29. Labille J., Brant J., Villieras F. et al. Affinity of C₆₀ fullerenes with water. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.*, 2006, vol. 14, p. 307.
30. Chen K.L., Elimelech M. Relating colloidal stability of fullerene (C₆₀) nanoparticles to nanoparticle charge and electrokinetic properties. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 7270.
31. Brant J., Lecoanet H., Wiesner M.R. Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. *J. Nanopart. Res.*, 2005, vol. 7, p. 545.
32. Chen K.L., Elimelech M. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Langmuir*, 2006, vol. 22, p. 10994.
33. Brant J.A., Labille J., Bottero J.Y., Wiesner M.R. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry. *Langmuir*, 2006, vol. 22, p. 3878.
34. Labille J., Masion A., Ziarelli F. et al. Hydration and dispersion of C₆₀ in aqueous systems: the nature of water-fullerene interactions. *Langmuir*, 2009, vol. 25, p. 11232.
35. Prylutsky Yu.I., Petrenko V.I., Ivankov O.I. et al. On the origin of C₆₀ fullerene solubility in aqueous solution. *Langmuir*, 2014, vol. 30, p. 3967.
36. Wierzbicki M., Sawosz E., Grodzik M. et al. Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.*, 2013, vol. 8, p. 195.
37. Mchedlov-Petrosyan N.O., Klochov V.K., Andrievsky G.V. Colloidal dispersions of fullerene C₆₀ in water: some properties and regularities of coagulation by electrolytes. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1997, vol. 93, p. 4343.
38. Meng Z., Hashmi S.M., Elimelech M. Aggregation rate and fractal dimension of fullerene nanoparticles via simultaneous multiangle static and dynamic light scattering measurement. *J. Colloid Interface Sci.*, 2013, vol. 392, p. 27.
39. Khokhryakov A.O., Avdeev M.V., Aksenov V.L., Bulavin L.A. Structural organization of colloidal solution of fullerene C₆₀ in water by data of small angle neutron scattering. *J. Mol. Liq.*, 2006, vol. 127, p. 73.
40. Li L., Bedrov D., Smith G. A molecular-dynamics simulation study of solvent-induced repulsion between C₆₀ fullerenes in water. *J. Chem. Phys.*, 2005, vol. 123, p. 204504.
41. Li L., Bedrov D., Smith G.D. Water-induced interactions between carbon nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, p. 10509.
42. Wang C.I., Hua C.C., Chen S.A. Dynamic solvation shell and solubility of C₆₀ in organic solvents. *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, p. 9964.
43. Choi J., Snow S.D., Kim J.-H., Jang S.S. Interaction of C₆₀ with water: first-principles modeling and environmental implications. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, vol. 49, p. 1529.
44. Montellano A., Da Ros T., Bianco A., Prato M. Fullerene C₆₀ as a multifunctional system for drug and gene delivery. *Nanoscale*, 2011, vol. 3, p. 4035.
45. Li Z.-Q., Zhang Y.-M., Guo D.-S. et al. Supramolecular assembly with multiple preorganised π -electronic. *Cages Chem. Eur. J.*, 2013, vol. 19, p. 96.
46. Lyon D.Y., Adams L.K., Falkner J.C., Alvarez P.J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. *J. Environ. Sci. Tech.*, 2006, vol. 40, p. 4360.
47. Song M., Liu S., Yin J., Wang H. Interaction of human serum album and C₆₀ aggregates in solution. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, p. 4964.
48. Zhao X., Striolo A., Cummings P.T. C₆₀ binds to and deforms nucleotides. *Biophys. J.*, 2005, vol. 89, p. 3856.
49. Prylutsky Yu.I., Buchelnikov A.S., Voronin D.P. et al. C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, p. 9351.

50. Voronin D.P., Buchelnikov A.S., Kostjukov V.V. et al. Evidence of entropically driven C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *J. Chem. Phys.*, 2014, vol. 140, p. 104909.
51. Walther J.H., Jaffe R.L., Kotsalis E.M. et al. Hydrophobic hydration of C₆₀ and carbon nanotubes in water. *Carbon*, 2004, vol. 42, p. 1185.
52. Hazafy D., Salvia M.-V., Mills A. et al., NMR analysis of Nile Blue (C. I. Basic Blue 12) and Thionine (C. I. 52000) in solution. *Dyes Pigments*, 2011, vol. 88, p. 315.
53. Santiago A.A.H., Buchelnikov A.S., Rubinson M.A. et al. Shape-independent model (SHIM) approach for studying aggregation by NMR diffusometry. *J. Chem. Phys.*, 2015, vol. 142, p. 104202.
54. Corti M., Degiorgio V. Quasi-elastic light scattering study of intermicellar interactions in aqueous sodium dodecyl sulfate solutions. *J. Phys. Chem.*, 1981, vol. 85, p. 711.
55. Attwood D., Blundell R., Mosquera V. Light scattering studies on the association of phenothiazine drugs in aqueous solutions of low ionic strength. *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 157, p. 50.
56. Lu F., Haque S.A., Yang S.-T. et al. Aqueous compatible fullerene–doxorubicin conjugates. *J. Phys. Chem. C*, 2009, vol. 113, p. 17768.
57. Liu J.-H., Cao L., Luo P.G., et al. Fullerene-conjugated doxorubicin in cells. *Appl. Mater. Interfaces*, 2010, vol. 2, p. 1384.
58. Evstigneev M.P. Hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 2014, vol. 33, p. 229.
59. Prylutsky Yu., Borowik A., Gołuski G. et al. Biophysical characterization of the complexation of C₆₀ fullerene with doxorubicin in a prokaryotic model. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, 2016, vol. 47, p. 92.
60. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O. et al. C₆₀ fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs R&D*, 2014, vol. 14, p. 333.
61. Skamrova G.B., Laponogov I.V., Buchelnikov A.S. et al. Interceptor effect of C₆₀ fullerene on the *in vitro* action of aromatic drug molecules. *Eur. Biophys. J.*, 2014, vol. 43, p. 265.
62. Prylutska S., Panchuk R., Gołuski G. et al. C₆₀ fullerene enhances anticancer activity and overcomes tumor cells drug resistance. *Nano Res.*, 2017, vol. 10, p. 652.
63. Evstigneev M.P., Buchelnikov A.S., Voronin D.P. et al. Complexation of C₆₀ fullerene with aromatic drugs. *Chem. Phys. Chem.*, vol. 14, p. 568.
64. Buchelnikov A.S., Kostjukov V.V., Evstigneev M.P., Prylutsky Yu.I. Mechanism of complexation of the phenothiazine dye methylene blue with fullerene C₆₀. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2013, vol. 87, p. 662.
65. Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Pashkova I.S. et al. Characterization of C₆₀ fullerene complexation with antibiotic doxorubicin. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, vol. 16, p. 23164.
66. Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Cherepanov V.V. et al. Structural organization of C₆₀ fullerene, doxorubicin and their complex in physiological solution as promising antitumor agents. *J. Nanopart. Res.*, 2015, vol. 17, p. 45.
67. Prylutsky Yu.I., Cherepanov V.V., Evstigneev M.P. et al. Structural self-organization of C₆₀ and cisplatin in physiological solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, vol. 17, p. 26084.
68. Rohr J., Hertweck C. *Comprehensive Natural Products II – Chemistry and Biology*. Mander L. and Liu H.-W. (Eds.). Elsevier: Oxford, 2010, pp. 227-303.
69. Ostash B., Korynevskaya A., Stoika R., Fedorenko V. Chemistry and biology of landomycins, an expanding family of polyketide natural products. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2009, vol. 9, p. 1040.
70. Kharel M.K., Pahari P., Shepherd M.D. et al. Angucyclines: biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 2012, vol. 29, p. 264.
71. Lehka L.V., Panchuk R.R., Berger W. et al. The role of reactive oxygen species in tumor cells apoptosis induced by Landomycin A. *Ukr. Biochem. J.*, 2015, vol. 87, p. 72.
72. Yang X., Fu B., Yu B. Total synthesis of Landomycin A, a potent antitumor angucycline antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, p. 12433.
73. Dalavalle M., Leonzio M., Calvaresi M., Zerbetto F. Explaining fullerene dispersion by using micellar solutions. *Chem. Phys. Chem.*, 2014, vol. 15, p. 2998.
74. Injac R., Perse M., Cerne M. et al. Protective effects of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials*, vol. 30, p. 1184.

**SELF-ASSEMBLY OF FULLERENE AND ITS COMPLEXES WITH CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS -
PERSPECTIVE ANTINEOPLASTIC AGENTS****Mosunov A.A., Salo V.A., Voronin D.P., Evstigneev M.P.**

Sevastopol State University

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

Abstract. The self-association of unmodified C₆₀ fullerene and its complexation with chemotherapeutic drugs (in particular, doxorubicin, cisplatin and landomycin A) in aqueous solution are considered as a possible key stage of the *in vivo* and *in vitro* biological synergy mechanism observed with the combined use of drugs with C₆₀ fullerene. A complete characterization of the aqueous fullerene solution has been performed; hypotheses have been put forward on the nature of the intermolecular forces stabilizing the fullerene conglomerates. The sizes of fullerene clusters were estimated, and this parameter was compared with the biological activity of the drug and its complexes with other biologically active compounds. For the first time, a mathematical model is proposed for calculating the thermodynamic parameters of fullerene aggregation. The results of the application of various physicochemical methods are analyzed, which makes it possible for better understanding the nature of the forces stabilizing the complexes of fullerene C₆₀ with these drugs. A physicochemical mechanism is proposed which allows, at least partially, explain the biological interaction of the drug C₆₀.

Key words: fullerene C₆₀, antibiotic, aqueous solution, aggregation.

ОЦЕНКА КОЭФФИЦИЕНТА АБСОРБЦИИ УГЛЕРОДА КУЛЬТУРОЙ *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD.

Кальпа В.А.¹, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет

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

² ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Поступила в редакцию: 23.09.2019

Аннотация. Проведена оценка предельной продуктивности и коэффициента абсорбции углерода культурой *Dunaliella viridis*, выращиваемой при барботаже суспензии с помощью аквариумного распылителя. При условии, что содержание углекислого газа в воздухе составляет 0,04 %, предельная продуктивность культуры микроводорослей составляет 0,622 г СВ/(л·сут), при этом минимальный объем воздуха, который необходимо подать в фотобиореактор для выращивания 1 г биомассы, составляет 2310 л. При увеличении доли углекислого газа в воздухе на 0,01 %, величина предельной продуктивности возрастает в 1,35 раза. Экспериментально показано, что при поверхностной освещенности фотобиореактора 10 клк, скорости продувки воздуха 1 л/л в минуту, коэффициент абсорбции углерода культурой *D. viridis* составляет 18 %, а количество клеток, которое может вырасти на одном грамме углерода – 0,74 млн./мл. Проведена сравнительная оценка коэффициента абсорбции углерода различными видами микроводорослей. Отмечены изменения величины данного параметра у *D. viridis*, *P. purpureum* и *D. salina*, что может быть объяснено не одинаковыми световыми условиями. Определенные в данной работе обобщенные параметры роста микроводорослей могут использоваться при оптимизации их выращивания при различных способах подачи углерода.

Ключевые слова: *Dunaliella viridis*, накопительная культура, максимальная продуктивность, углекислый газ, воздух.

ВВЕДЕНИЕ

Соединения углерода составляют основу земной жизни, а их свойства во многом определяют спектр условий, в которых подобные формы жизни могут существовать. Любой живой организм состоит в значительной степени из углерода. Источником углерода для живых организмов обычно является CO₂ из атмосферы или воды. В результате фотосинтеза он попадает в биологические пищевые цепи, в которых живые существа поедают друг друга или останки друг друга и тем самым добывают углерод для строительства собственного тела. Углерод характеризуется наибольшим из известных количеством аллотропных модификаций: алмаз, графит, лонсдейлит, фуллерен, аморфный углерод, уголь, трехуглерод, сажа. В отношении водорослей выявлена зависимость уменьшения численности и разнообразия в ряду фуллерен - нанотрубки - уголь - графит.

Dunaliella viridis Teod. – широко распространенный, легко культивируемый вид, обитающий в морях и соленых озерах [1]. Как и другие представители рода, является природным источником каротиноидов, глицерина, липидов и многих других биологически активных соединений [2-4]. На скорость роста культуры *D. viridis* влияют многие факторы: световые, температурные условия, степень обеспеченности биогенными элементами. Наряду с азотом и фосфором углерод является наиболее важным элементом в биомассе микроводорослей, содержание которого составляет около 50 % [5]. При культивировании *D. viridis* углерод может подаваться в фотобиореактор тремя способами: 1. С помощью системы брожения (здесь используется спиртовое брожение: дрожжи превращают сахар в спирт и одновременно выделяют CO₂); 2. С помощью баллонов с сжиженным газом (минус в том, что нужно часто менять баллоны с газом и высокая стоимость такого метода); 3. Неоправданно высокий расход углекислоты при выращивании микроводорослей ведёт к удорожанию получаемой биомассы. Выходом из такой ситуации может служить создание благоприятных условий, способствующих растворению углекислого газа, содержащегося в воздухе, в форме, оптимальной для использования клетками микроводорослей (увеличение удельной площади соприкосновения жидкой и газообразной фаз).

Различные режимы подачи углекислоты в жидкую фазу направлены на поддержание оптимальной концентрации углерода в доступной форме в питательной среде. Когда рост культур микроводорослей не ограничен минеральным питанием и светом, недостаток углерода может являться основным лимитирующим фактором. Таким образом, подбор оптимального способа подачи углерода в культуральную среду для *D. viridis* при отсутствии минерального и светового лимитирования является определяющим для интенсивного культивирования данного объекта. Представляется актуальным провести сравнительную оценку предельной продуктивности культур микроводорослей с экспериментально полученными значениями продуктивности при увеличении поверхности соприкосновения фаз «воздух - жидкая среда». Основным параметром, характеризующим интенсивность поглощения углерода микроводорослями, является коэффициент абсорбции [6].

Цель работы: оценить коэффициент абсорбции CO_2 культурой *Dunaliella viridis* и сравнить полученные данные с другими объектами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились с культурой зелёной морской микроводоросли *Dunaliella viridis* Teod. из коллекции культур ФИЦ ИнБЮМ. Температуру поддерживали на уровне 24-26°C. Культуру выращивали на питательной среде для морских зелёных микроводорослей [7] в унифицированной установке [8] в лабораторных фотобиореакторах плоскопараллельного типа толщиной 2 см при круглосуточном искусственном освещении люминесцентными лампами Philips, средняя освещённость на поверхности фотобиореактора составляла 10 клк. Барботажа культур осуществляли аквариумным компрессором, скорость подачи воздуха составляла 1 л/л культуры в минуту. Воздух подавался через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм.

Перед отбором проб для определения оптической плотности культуры *D. viridis* объём в фотобиореакторе доводили дистиллированной водой до начального, компенсируя испарение. Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в фотобиореакторе, абсолютная погрешность измерений составляла 0,5°C. Среднюю освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116 по шести точкам. Отбор проб для определения оптической плотности и числа клеток проводили из разных точек внутри фотобиореактора: отбирали по 0,2 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 2 мл. В средней пробе после перемешивания определяли оптическую плотность, производили подсчёт клеток с помощью 4-х сеточной камеры Горяева. Оптическую плотность рассчитывали по формуле:

$$D = -\lg(T),$$

где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1%.

При определении биомассы (сухого веса) величину оптической плотности умножали на эмпирический коэффициент $k_{D750} = 0,8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед.опт.пл.}^{-1}$ [9]. Обработку экспериментальных данных осуществляли в Libre Office и Scidavis.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведём предельную оценку продуктивности культуры морских микроводорослей при использовании в качестве источника углерода CO_2 воздуха, скорость подачи которого составляла 1 л/мин. на 1 л культуры. Учитывая, что объёмная концентрация углекислого газа в атмосферном воздухе составляет около 0,04% [10] объём CO_2 , проходящий через 1 л культуры, составит:

$$V(\text{CO}_2) = 0,4 \text{ мл/мин.}$$

Считая условия нормальными и учитывая молярную массу CO_2 , получим эквивалент по массе углекислого газа, проходящего через 1 л культуры:

$$m(\text{CO}_2) = 0,792 \text{ г/мин.}$$

Рассчитав массовую долю углерода в CO_2 ($w = 0,273$), получим массу углерода в подаваемом воздухе на 1 л культуры в сутки:

$$m(\text{C}) = 0,311 \text{ г/сут.}$$

Считая условия для растворения CO_2 идеальными (углекислый газ полностью переходит в культуральную жидкость) и, считая, что содержание углерода в биомассе микроводорослей составляет 50% [4], получим предельное значение продуктивности с 1 л культуры в сутки:

$$P_{\max} = 0,622 \text{ г/(л·сут).}$$

Аналогичные расчёты можно провести для определения минимального количества воздуха, необходимого для выращивания 1 грамма биомассы микроводорослей: учитывая, что содержание углерода в биомассе – примерно 50%, следовательно, необходимо подать 0,5 г чистого углерода или, учитывая долю углерода в углекислом газе, 1,83 г CO_2 . Объём CO_2 определим с учётом известной молярной массы для нормальных условий:

$$V(\text{CO}_2) = 0,924 \text{ л.}$$

Таким образом, минимальный объём воздуха, который необходимо подать в фотобиореактор для

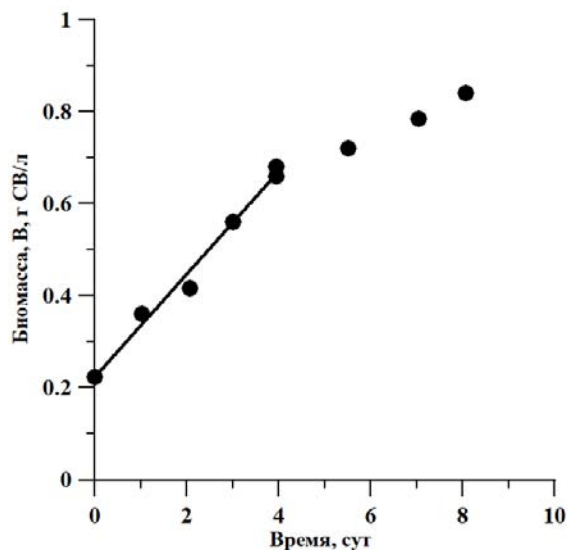


Рисунок 1. Динамика плотности культуры *D. viridis*. Линия – аппроксимация линейной фазы роста уравнением (1) Максимальная скорость роста $P_m = 0,11$ г СВ/(л·сут)

выращивания 1 г биомассы микроводорослей, примерно составляет:

$$V_{\text{возд}} = 0,924 / 0,0004 = 2310 \text{ л.}$$

В предыдущей работе [6] показано, что при содержании CO_2 в воздухе 0,03% максимальная продуктивность составляет 0,46 г/(л·сут), а минимальный объём воздуха для выращивания 1 г биомассы – 3111 л. Таким образом, при увеличении доли CO_2 на 0,01%, продуктивность увеличивается в 1,35 раза, а $V_{\text{воздуха}}$ соответственно уменьшается.

Полученные теоретические значения максимальной продуктивности культур микроводорослей верны только для условий ограничения скорости роста количеством подаваемого углекислого газа, в то время как световые условия и минеральное обеспечение не являются лимитирующими факторами.

Для верификации полученных значений максимальной продуктивности проведён эксперимент по выращиванию *D. viridis* в накопительной культуре. Определим параметр максимальной продуктивности (скорости роста) микроводоросли. Для этого аппроксимируем линейную фазу роста уравнением:

$$B = B_0 + P_m \cdot t, \quad (1)$$

где B_0 – начальная биомасса; P_m – максимальная продуктивность.

Определим параметр максимальной скорости роста *D. viridis* по численности клеток. Для этого аппроксимируем линейную фазу роста кривой по численности клеток уравнением:

$$N = N_0 + \rho_m \cdot t, \quad (2)$$

где N_0 – начальная численность клеток; ρ_m – максимальная продуктивность по численности клеток.

С учётом рассчитанной предельной продуктивности P_{max} , мы можем определить коэффициент абсорбции углерода культурой *D. viridis*:

$$k_A = \frac{0,11 \text{ г СВ/(л·сут)}}{0,62 \text{ г СВ/(л·сут)}} \approx 0,18.$$

Полученное значение показывает, что только 18% от подаваемого углерода в форме углекислого газа перешло в биомассу. Также представляет интерес величина, характеризующая максимальный прирост числа клеток *D. viridis* на одном грамме углерода в одном литре культуры:

$$N_A = \frac{0,23 \text{ млн кл./мл·сут}}{0,31 \text{ г С/сут}} \approx 0,74 \frac{\text{млн кл./мл}}{\text{г С}}.$$

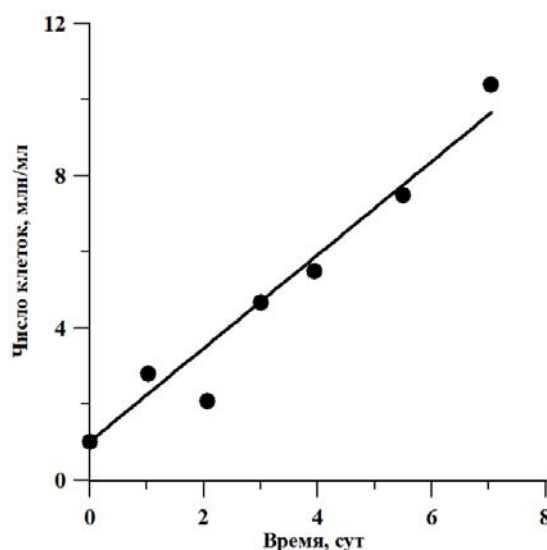


Рисунок 2. Динамика численности клеток *D. viridis*. Линия – аппроксимация линейной фазы роста уравнением (2) Максимальная продуктивность по численности клеток $\rho_m = 0,23$ млн/(мл·сут)

В литературе приводятся данные о величине максимальной продуктивности зелёных и красных видов микроводорослей, культивируемых при барботаже суспензии с помощью аквариумного распылителя. На рисунке 3 представленные накопительные кривые роста *P. purpureum* и *D. salina* по данным работ [6, 11].

В таблице 1 сведены данные о максимальной продуктивности и коэффициенте абсорбции углерода, учитывая, что скорость подачи воздуха составляет 1 л/л в минуту, а предельная продуктивность 0,62 г СВ/(л·сут).

Представленные в таблице 1 значения показывают значительные различия между величиной коэффициента абсорбции углерода, полученного в данной работе и определённого по литературным данным. Конечно, данный параметр априори не может составлять 100%, так как часть подаваемого в культиватор углекислого газа не будет поглощена клетками. Поглощение микроводорослями углерода из внешней среды является сложным процессом. Температура, pH среды в первую очередь определяют растворимость газов в жидкой среде. Отметим, что во всех экспериментах для указанных в таблице 1 видов температура и pH были примерно одинаковыми и составляли 26-28°C и 8-9 единиц pH и 8-9 единиц pH соответственно.

Различия значений максимальной продуктивности и коэффициента абсорбции могут быть объяснены неодинаковыми световыми условиями экспериментов. Так в эксперименте с *D. salina* [11] поверхностная освещённость культиватора составляла 15 клк, а в эксперименте с *P. purpureum* [6] – 13 клк. Известно, что именно световые условия оказывают первостепенное влияние на рост микроводорослей в целом, а также на скорость многих ферментативных процессов, в частности на скорость фиксации и преобразования углекислого газа.

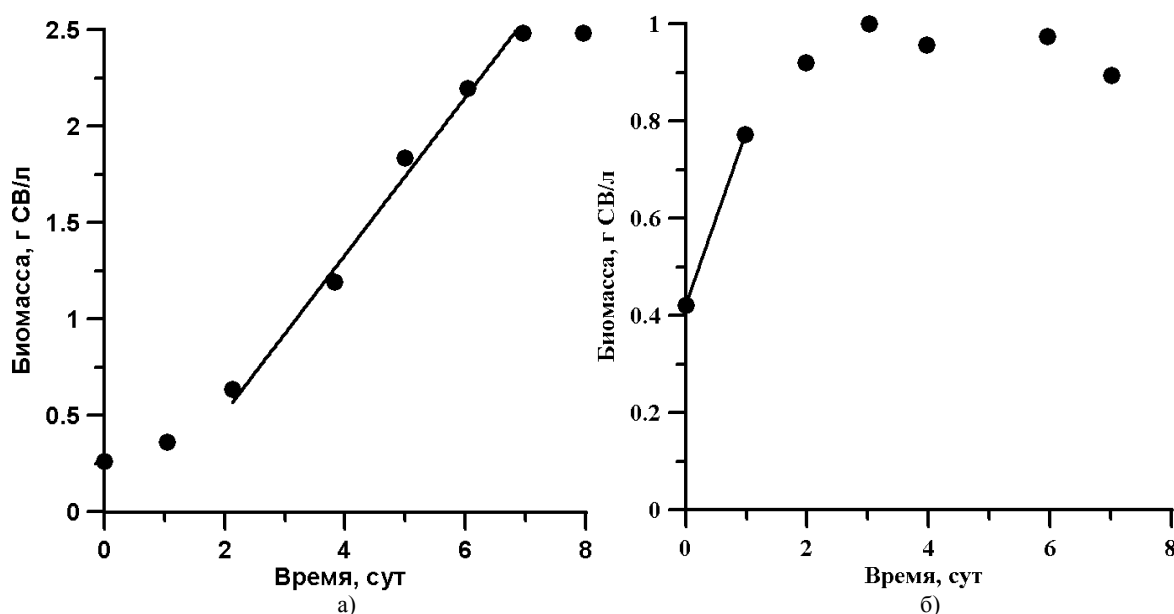


Рисунок 3. Накопительные кривые роста *P. purpureum* [6] (а) и *D. salina* [11] (б). Линия – аппроксимация экспериментальных данных линейным уравнением, максимальная продуктивность $P_m = 0,39$ г СВ/л·сут и 0,34 г СВ/л·сут соответственно

Таблица 1. Максимальная продуктивность и коэффициент абсорбции углерода различными видами микроводорослей, культивируемых при барботаже суспензии с помощью аквариумного распылителя

	P_m , г СВ/(л·сут)	k_A , %
<i>D. viridis</i>	0,11	18
<i>D. salina</i> (Гудвиллович)	0,34	55
<i>P. purpureum</i> (Лелеков)	0,31	50

Например, исследования CO_2 -концентрирующего механизма зелёных видов микроводорослей, показали, что АТФ обеспечивает энергией транспорт углерода внутри клеток, который осуществляется против градиента его концентрации [12]. Для окисленных фотоавтотрофов АТФ образуется преимущественно в световых реакциях фотосинтеза, таким образом, свет оказывает влияние не только на скорость преобразования углекислого газа в первичные углеводы, но и на скорость транспорта углерода. Таким образом, рост культуры *D. viridis* в данном эксперименте мог быть лимитирован световыми условиями, так как поверхностная освещённость составляла 10 клк.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопросы обеспеченности клеток микроводорослей биогенными элементами имеют первостепенное значение не только в научных исследованиях, но и промышленном культивировании. Так как углерод составляет половину сухой биомассы, то потребность микроводорослей в углероде максимальна по сравнению с другими элементами. Использование углекислого газа воздуха представляется наименее затратным способом обеспечения клеток углеродом. На сегодняшний день работы в данном направлении идут по пути увеличения количества воздуха, прокачиваемого через суспензию микроводорослей [13], либо по увеличению площади соприкосновения фаз «воздух - жидкая среда». В данной работе определены обобщённые параметры роста культуры микроводорослей, которые могут использоваться для оптимизации выращивания микроводорослей при различных способах подачи углерода. Параметр максимальной продуктивности культуры является идеализацией представлений о субстратзависимом росте, тем не менее, необходим для предельной оценки системы культивирования микроводорослей. Коэффициент абсорбции, показывающий долю поглощённого углерода, при прочих заданных внешних условиях, позволяет судить не только о технической реализации системы культивирования, но и о внутриклеточной организации CO_2 -концентрирующего механизма. Анализ литературных данных о механизмах поглощения неорганических форм углерода клетками микроводорослей показал, что организация CO_2 -концентрирующего механизма (ССМ) у различных систематических групп различная. Кроме того, на кинетику процесса поглощения оказывает влияние величина облучённости клеток. Тем не менее, коэффициент абсорбции можно рассматривать как обобщённый показатель организации ССМ микроводорослей.

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

Список литературы / References:

- Боровков А.Б. Зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (обзор). *Экология моря*, 2005, т. 67, с. 5-17. [Borovkov A.B. Green microalga *Dunaliella salina* Teod. (review). *Ecologiya morya*, 2005, vol. 67, pp. 5-17. (In Russ.)]
- Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod.* Киев: Наукова думка, 1973, 487 с. [Masuk N.P. *Morphology, systematics, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella Teod.* Kyev: Naukova dumka, 1973, 487 p. (In Russ.)]
- Oren A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, 2005, URL: <http://www.salinesystems.org/content/1/1/2>. DOI: 10.1186/1746-1448-1-2.
- Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M. Mode of action of the massively accumulated, β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 1040-1043.
- Кожемяка А.Б. Зависимость концентрации органического вещества в клетке от её объёма для черноморских видов *Bacillariophyta*. *Морской экологический журнал*, 2014, т. 8, № 1, с. 35-43. [Kozhemyaka A.B. The dependence of the concentration of organic matter in the cell on its volume for the Black Sea species of *Bacillariophyta*, *Morskoy ekologicheskiy zhurnal*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 35-43. (In Russ.)]
- Лелеков А.С., Гудвиллович И.Н., Геворгиз Р.Г., Тренкеншу Р.П., Бадисова А.О. Оценка коэффициента абсорбции углерода культурой *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. *Сборник материалов Всерос. науч.-практ. конф. к 145-летию Севастопольской биологической станции (Севастополь, 19-24 сент. 2016 г.)*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016, т. 3, с. 404-407. [Lelekov A.S., Gudvilovich I.N., Gevorgiz R.G., Trenkenshu R.P., Badisova A.O. Estimation of carbon absorption coefficient by *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross culture. *Collection of materials Vseros. scientific-practical conf. to the 145th anniversary of the Sevastopol Biological Station (Sevastopol, September 19-24, 2016)*. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysics, 2016, vol. 3, pp. 404-407. (In Russ.)]
- Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли

Platymonas viridis. Биология моря, 1979, т. 51, с. 41-46. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. The effect of mineral nutrients on the productivity of the alga *Platymonas viridis*. *Biologiya morya*, 1979, vol. 51, pp. 41-46. (In Russ.)]

8. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13), URL: <http://algology.ru/1097> [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. The unified installation for laboratory research of microalgae. *Issues of modern algology*, 2017, no. 1 (13), URL: <http://algology.ru/1097> (In Russ.)]

9. Меметшаева О.А. Репродуктивная активность клеток *Dunaliella viridis* Teod. при разном углеродном обеспечении в накопительной культуре. *Вопросы современной альгологии*, 2018, № 3 (18), URL: <http://algology.ru/1369> [Memetshaeva O.A. Reproductive activity of *Dunaliella viridis* Teod. cells. with different carbon supply in the funded culture. *Issues of modern algology*, 2018, no. 3 (18), URL: <http://algology.ru/1369> (In Russ.)]

10. Doney S.C., Fabry V.J., Feely R.A., Kleypas J.A. Ocean Acidification: the other CO₂ problem. *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 2009, vol. 1, pp. 169-192.

11. Гудвилович И.Н., Боровков А.Б. Продуктивность микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. при различных способах внесения углекислого газа в культуру. *Морской биологический журнал*, 2017, т. 2, № 2, с. 34-40. DOI: 10.21072/mbj.2017.02.2.03. [Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Microalgae productivity *Dunaliella salina* Teod. with various methods of introducing carbon dioxide into the culture. *Morskoy ekologicheskiy zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 34-40. DOI: 10.21072/mbj.2017.02.2.03. (In Russ.)]

12. Пронина Н.А. Организация и физиологическая роль CO₂-концентрирующего механизма при фотосинтезе микроводорослей. *Физиология растений*, 2000, т. 47, № 5, с. 801-810. [Pronina N.A. Organization and physiological role of the CO₂-concentrating mechanism in microalgae photosynthesis. *Fiziologiya rasteniy*, 2000, vol. 47, no. 5, pp. 801-810. (In Russ.)]

13. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Лелеков А.С., Нехорошев М.В. Промышленная технология производства фукоксантина на основе интенсивной культуры морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin в газовихревом фотобиореакторе. *Российский биотерапевтический журнал*, 2016, т. 15, № 1, с. 22. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Zozulya U.V., Uvarov I.P., Lelekov A.S., Nekhoroshev M.N. Industrial technology for the production of fucoxanthin based on the intensive culture of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin in a gas-vortex photobioreactor. *Russian Journal of Biotherapy*, 2016, vol. 14, no. 1, p. 22. (In Russ.)]

EVALUATION OF THE CARBON ABSORPTION COEFFICIENT OF *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD.

Kalpa V.A.¹, Lelekov A.S.²

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: faultyradioreceiver@gmail.com

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nakhimova Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Abstract. The estimation of limit productivity and coefficient of carbon absorption by *Dunaliella viridis* culture grown during bubbling of suspension with the help of aquarium spray was carried out. Provided that the content of carbon dioxide in the air is 0.04 %, the limit productivity of the culture of microalgae is 0.622 g SV/(l-day), while the minimum volume of air that must be fed to the photobioreactor for growing 1 g of biomass is 2310 L. With an increase in the proportion of carbon dioxide in the air by 0.01%, the value of the limit productivity increases by 1.35 times. It was experimentally shown that at the surface illumination of a photobioreactor of 10 klx, the air purge rate of 1 l / 1 per minute, the absorption carbon coefficient of *D. viridis* culture is 18 %, and the number of cells that can grow on one gram of carbon is 0.74 million/ml. a comparative assessment of the absorption carbon coefficient of different types of microalgae was carried out. Changes in the value of this parameter were observed in *D. viridis*, *P. purpureum* and *D. salina*, which can be explained by different light conditions. The generalized parameters of microalgae growth defined in this paper can be used to optimize their cultivation with different methods of carbon supply.

Key words: *Dunaliella viridis*, storage culture, maximum productivity, carbon dioxide, air.

О МЕХАНИЗМАХ ХИРАЛЬНОСТИ МАКРОСКОПИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Твердислов В.А., Мазуров М.Е., Яковенко Л.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, д. 1, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: mazurov37@mail.ru

Поступила в редакцию: 05.05.2018

Аннотация. Установлено, что механизмы хиральности и хиральные свойства являются инвариантными как для макроскопических, так и для микроскопических объектов. Хиральные системы обладают рядом замечательных свойств, позволяющих реализовать самоорганизацию в сложных системах. В данной работе рассмотрены свойства хиральных систем на примере энергоемких упругих закрученных нитей, обладающих запасом свободной энергии и элементами хиральной асимметрии. Установлены следующие свойства макроскопических хиральных систем: влияние упругости при сгибании нити, чем меньше упругость на изгиб, тем меньше шаг двойной спирали и наоборот; допустимо закручивать три, четыре и большее количество упругих нитей, ограничений нет. Прочность системы из нескольких скрученных нитей увеличивается при увеличении числа скрученных нитей; хиральные системы являются аккумуляторами энергии; имеется возможность роста «усов» в хиральной системе; необходимость существования «замков» в хиральных структурах, соединяющих отдельные скрученные нити хиральной системы; влияние начальных условий на возникновение хиральности; имеет место масштабная инвариантность скейлинг эволюции хиральных систем. Многие свойства хиральности для макроскопических механических систем имеет место и на молекулярном уровне.

Ключевые слова: макроскопические хиральные системы, энергоемкие закрученные нити, аккумуляторы энергии, замки хиральных систем, масштабная инвариантность.

Введение.

Установлено, что механизмы хиральности и хиральные свойства являются инвариантными как для макроскопических, так и для микроскопических объектов. Например, свойства хиральности для макроскопических механических систем можно наблюдать и для молекулярных систем. Более детально свойства макроскопических хиральных систем будут описаны ниже с разъяснениями о наличии этих свойств для молекулярных систем.

Хиральные системы обладают рядом замечательных свойств, позволяющих реализовать самоорганизацию в сложных системах. Области приложения хиральных систем весьма значительны, более подробные сведения изложены в работах, например, [1-4]. В данной работе будут рассмотрены свойства хиральных систем на примере энергоемких упругих закрученных нитей, обладающих запасом свободной энергии и элементами хиральной асимметрии.

1. Математическая модель хиральной системы.

Хиральная система может быть получена путем закручивания двух упругих нитей. Рассмотрение данной «хиральной» системы является удобным для исследования влияния параметров нити – упругости к закручиванию, упругости к сгибанию относительно длины на динамику процесса закручивания и параметров, возникающих при этом шагов спиральной нити.

Уравнение хиральной системы в виде двух закрученных упругих нитей можно записать в виде системы двух дифференциальных уравнений в частных производных гиперболического типа.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial^2 u_1}{\partial t^2} = D_1 \Delta u_1 + \alpha_1 u_1 + \beta_1 f_{12}(u_2) \\ \frac{\partial^2 u_2}{\partial t^2} = D_2 \Delta u_2 + \alpha_2 u_2 + \beta_2 f_{21}(u_1) \end{array} \right. , \quad (1)$$

где u – отклонение фазы от состояния равновесия в плоскости, нормальной направлению нитей; f_{12} и f_{21} характеризуют связь упругих нитей; α_1, α_2 – константы, характеризующие линейную составляющую упругости; D_1, D_2 – коэффициенты диффузии; Δu – лапласиан в цилиндрических координатах, равный

$$\Delta u = \frac{1}{R^2} \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{1}{R} \frac{\partial u}{\partial r} + \frac{\partial^2 u}{\partial \varphi^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2}.$$

Связь упругих нитей реализуется через их взаимодействие по их длине. При этом существенное значение имеет толщина упругих нитей, поскольку каждая из нитей закручивается относительно другой, как вокруг цилиндра. При умеренной связи зависимость связей от отклонения можно считать линейной, то есть

$$f_{12}(u_2) = \beta_1 u_2; \quad f_{21}(u_1) = \beta_2 u_1.$$

В первом приближении можно не учитывать процессы распространения возбуждения в вертикальной плоскости по оси OZ, и считать тела маятников твердыми. Уравнение для отклонения можно записать в виде

$$\begin{cases} \frac{\partial^2 u_1}{\partial t^2} = \alpha_1 u_1 + \beta_1 u_2 \\ \frac{\partial^2 u_2}{\partial t^2} = \alpha_2 u_2 + \beta_2 u_1 \end{cases}.$$

Уравнение (1) является нелинейным дифференциальным уравнением в частных производных гиперболического типа. В случае симметричности закрученных нитей $f_{12} = f_{21}$. Нити нельзя считать бесконечно тонкими. Эту линию в дальнейшем считаем бесконечно тонкой, если нет другой оговорки.

Представляет интерес, каким образом происходит взаимодействие нитей двойной хиральной системы. Установлено, что касание нитей при конечной их толщине происходит по винтовой линии. В общем случае сами закручиваемые нити, как было отмечено, не могут быть бесконечно тонкими, поскольку закручивание происходит именно вокруг этих линий. В дальнейшем полагаем, что нити имеют круглое сечение диаметром d_0 . Теоретически можно представить взаимное закручивание двух бесконечно тонких нитей вокруг бесконечно тонкой линии касания лишь при предельном переходе при $d_0 \rightarrow 0$.

Линия связи может иметь в ряде случаев и другую форму. Взаимодействие закрученных энергоемких нитей может быть реализовано через гибкую полосу. Например, в виде спирально закрученной полоски, что имеет место при конформации белков. Основные закономерности взаимодействия сохраняются. Примером такой двойной хиральной структуры являются также спиральные структуры ДНК.

2. Физические свойства механической хиральности.

2.1 Свойства, обусловленные наличием свободной энергии.

Интересным свойством механических хиральных систем является возможность фиксации потенциальной энергии скрученных упругих нитей. Для фиксации состояний хиральной системы необходима установка двух замков. Один из замков связывает закрученные упругие нити в точке A , а другой из замков связывает закрученные упругие нити в точке B , стоящей от точки A на некоторое расстояние, равное l .

Эволюционирующая система, обладающая запасом свободной энергии и элементами хиральной асимметрии, реализуемая в виде скручиваемых нитей обладает следующими свойствами: 1) Влияние упругости при сгибании нити, чем меньше упругость на изгиб, тем меньше шаг двойной спирали и наоборот; 2) Допустимо закручивать три, четыре и большее количество упругих нитей, ограничений нет. Прочность системы из нескольких скрученных нитей увеличивается при увеличении числа скрученных нитей; 3) Хиральные системы являются аккумуляторами энергии; 4) Имеется возможность роста «усов» в хиральной системе; 5) Необходимость существования «замков» в хиральных структурах, соединяющих отдельные скрученные нити хиральной системы; 6) Влияние начальных условий на возникновение хиральности; 7) Имеет место масштабная инвариантность скейлинг эволюции хиральных систем.

2.2 Правила возникновения механических хиральных систем.

Можно сформулировать некоторые правила возникновения механических хиральных систем, учитывая общие правила возникновения хиральных систем [3-17].

Правило 1. Эволюционирующая система, обладающая запасом свободной энергии и элементами хиральной асимметрии, находясь в пределах одного иерархического уровня, способна в процессе самоорганизации изменять тип симметрии, повышая свою «сложность», но сохраняя знак преобладающей хиральности («правой»-D или «левой»-L закрученности).

Правило 2. Эволюционирующая система, обладающая запасом свободной энергии и элементами хиральной асимметрии, имеет тенденцию к спонтанному формированию через ряд бифуркаций последовательности иерархических уровней с чередующимся знаком хиральности заново образующихся структур и с увеличением их относительного масштаба.

Возможна самоорганизация до более сложных замкнутых хиральных систем. Пример такой самоорганизации, полученной в результате моделирования, показан на рисунке 1.

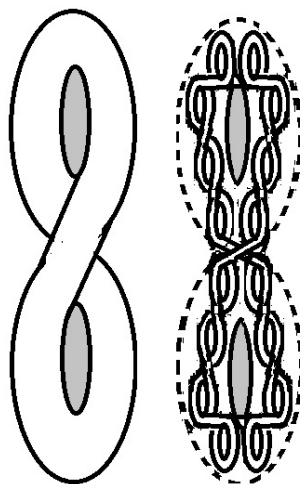


Рисунок 1. Пример сложной хиральной самоорганизации, полученной в результате моделирования

Рассмотрим более подробно отдельные свойства хиральных систем.

2.3 Хиральные системы – аккумуляторы энергии.

Одним из фундаментальных свойств хиральных систем является способность аккумулировать и сохранять энергию. Таким образом, хиральный объект является автономным аккумулятором энергии. Существенно то, что для сохранения запасенной энергии необходимо взаимодействие с внешней средой. Например, для механической системы закрученной пружины необходим упор, препятствующий её раскручиванию и являющийся внешней средой. В хиральной системе, состоящей из двух закрученных пружин, каждая упирается в другую, и энергия сохраняется без взаимодействия внешней средой.

2.4 Необходимость существования замков в хиральных структурах.

Необходимым условием создания автономного аккумулятора является наличие замка, фиксирующего стабильность гашения усилий обеих частей хиральной системы. Иллюстрация замков по обе стороны хиральной системы в виде сплошных прямоугольников показана на рисунке 2.

Рассмотрим хиральные системы с изменяющейся величиной закрутки вдоль линии. Уравнение винтовой линии, по которой происходит касание закрученных упругих нитей, может быть записано в параметрической форме. Из параметрического уравнения винтовой линии следует, что винтовая линия – трехмерный объект. Рассмотрим состояние двойной хиральной структуры, когда ее один конец наглухо закреплен, а другой свободен. В этом случае взаимное давление линий наибольшее в закрепленной части двойной хиральной структуры. При наличии трения вдоль оси винтовой линии, когда сила трения F пропорциональна давлению d справедливо соотношение $F = kd$. Если витки двойной хиральной структуры расположены равномерно, то давление d в них одинаковое. Если один из концов свободен, исходит постепенное ослабление взаимодействия ближе к свободному концу. Это обстоятельство приводит к двум последствиям: 1. Сила трения уменьшается по мере приближения конца спирали; 2. Длина витков двойной хиральной структуры возрастает по мере приближения к свободному концу. Рассмотрим хиральную систему, замкнутую на одном конце и свободную на другом конце. Величина скручивания в такой системе будет уменьшаться от замкнутого конца к свободному. При этом длина витка хиральной системы будет увеличиваться от начала к концу системы.

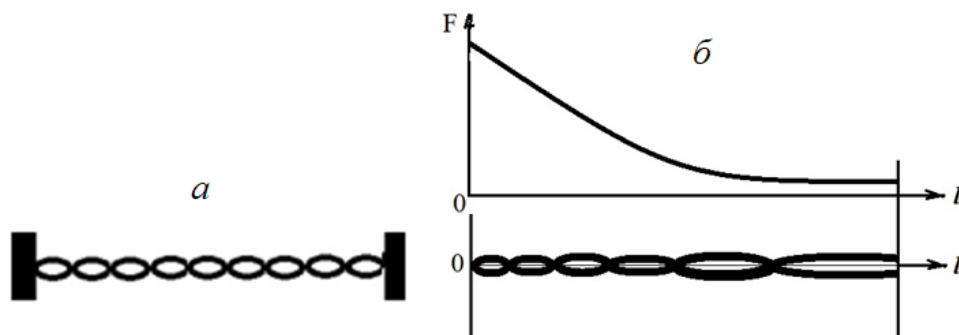


Рисунок 2. (а) Иллюстрация замков по обе стороны хиральной системы, показанных схематически в виде сплошных прямоугольников; (б) Наличие замка с одной левой стороны при свободной правой стороне, сверху показано уменьшение коэффициента трения между упругими нитями при движении слева направо. Хиральная система замкнутая на одном конце и разомкнутая на другом конце. Верхний рисунок – Зависимость силы трения двойной хиральной структуры с одним закрепленным и вторым свободным концами зависимость скручивания по длине нити. Нижний рисунок иллюстрирует увеличение длины витка скрученной нити при движении к свободному концу

Возникновение устойчивых хиральных структур в молекулярных биологических системах требует наличия застёжек скрученных упругих нитей спиралей. Примером взаимодействия хиральных структур в ДНК-белковых системах является «лейциновая молния». При связывании двух параллельных α -спиралей на уровне третичной структуры образуется левоспиральный димер, подобный застёжке-молнии, который взаимодействует с правозакрученной ДНК также на уровне третичной структуры

Эволюция хиральности при её развитии. Рождение и рост «усов».

Образование вторичной хиральности может приводить к появлению хиральности более высокого порядка. Причиной появления усов служит неустойчивость закрученной упругой нити, на которую действуют две силы закручивания: нормальная к нити и сила упругости нити, препятствующая смещению нити к центру спирали. Если давление вверх симметрии спирали, то возникает дополнительная сила, приводящая к появлению нормальной составляющей силы к направлению спирали. Эта сила может приводить либо к увеличению отклонения и образованию усов или к возвращению к прежнему состоянию равновесия [9, 10].

Рост усов обусловлен неустойчивостью и наличием флуктуаций в разных участках закрученной нити. Наличие закрутки упругой нити приводит к возможности отклонения нити в любую сторону. Отклонение компенсируется упругостью нити, которая препятствует увеличению отклонения. Если величина силы, обусловленной упругостью, больше силы, обусловленной отклонением, то устойчивость не нарушается. Если величина силы, обусловленной упругостью, меньше силы, обусловленной отклонением, то устойчивость нарушается и происходит двуххиральная эволюция нити по направлению нормальному прежнему направлению нити. В результате происходит образование «усов».

Между растущими в разных участках «усами» возникает конкуренция, приводящая к росту одного или большего числа усов (2-х, 3-х) и подавлению роста усов в других точках нити. В результате возникает один, два уса. Иллюстрация роста «усов» и получения хиральной системы, содержащей множество видов «усов» иллюстрируется рисунком 3, а, где показано образование одного и двух усов. Возможно образование более сложной структуры, содержащей три, четыре из многих усов, как показано на рисунке 3, б.

3. Некоторые приложения хиральности в макроскопических системах и на молекулярном уровне.

3.1 Образование сгустка крови – образование хиральных полимеров фибрина.

Хиральные процессы активно реализуются при свертывании крови, когда происходит образование тромба. Как происходит образование тромба? При повреждении мелких кровеносных сосудов остановка кровотечения в норме происходит через 1-3 мин. Этот первичный гемостаз определяется сужением сосудов и образованием на месте повреждения первичного тромба – агрегата одного из видов клеток крови, тромбоцитов. Дальнейшее создание плотного сгустка (вторичный гемостаз), надежно закрывающего место повреждения, обусловлено появлением белка фибрина. Полимеризация фибрина быстро приводит к образованию плотного геля, составляющего основу тромба. В нормальной, «жидкой» крови фибрина нет. Зато много его предшественника – фибриногена, из которого образуется фибрин в результате отщепления от него небольших фрагментов. Этот процесс показан на рисунке 4. Фермент тромбин расщепляет четыре пептидные связи, отщепляя четыре небольших фрагмента: фибринопептиды А и В.

Оставшиеся после такого отщепления мономеры фибрина быстро полимеризуются в длинные разветвленные цепочки. Таким образом, в зоне повреждения возникает сеть фибриновых полимеров, и вся среда переходит в новое, «твердое» агрегатное состояние – гель. Хорошо знакомое нам в быту состояние, которое в кулинарии было переведено с французским акцентом, – желе. Клетки крови оказываются заключенными в фибриновую сеть. Все вместе образуют тромб, закрывающий поврежденную часть сосуда. После образования геля довольно быстро происходят биохимические реакции, создающие поперечные сшивки между нитями полимеров фибрина. Это превращает сгусток в настоящее твердое тело.

Интересным примером аккумуляции энергии, рационального использования замковых структур в хиральной системе является мышечная структура сердца, реализующая режим движения крови

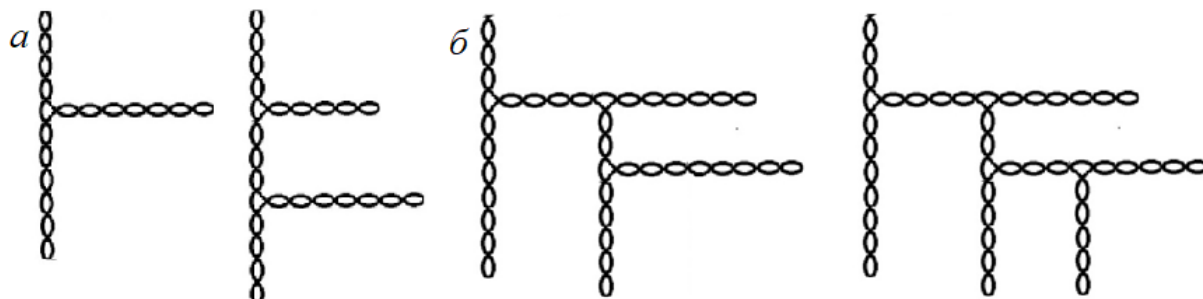


Рисунок 3. Иллюстрация роста «усов» и получения хиральной системы, содержащей множество видов «усов».

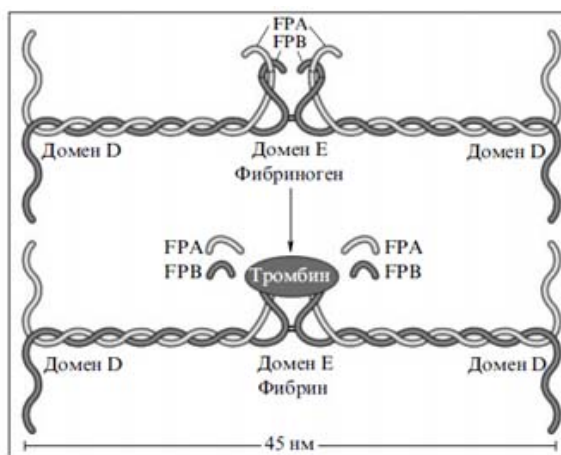


Рисунок 4. Образование полимера фибрина. Отщепление от фибриногена фибринопептидов А и В (FPA, FPB) под действием тромбина

3.2 Организация мышечного сокращения сердца, структура которого реализует хиральную структуру с двумя замками.

Рассмотрим мышечную структуру сердца, реализующую режим движения крови, основанный на использовании свойств вогнутых спиральных автоволн, переносящих энергию и хиральной структуры с двумя замками. Мышечные волокна сердца по спирали спускаются к верхушке сердца, а затем снова поднимаются к его основанию, как показано на рисунке 5, а [18, стр. 89-91].

Анатомическая структура сердца при удаленном эпикарде, иллюстрирующая мышечный слой желудочков сердца, при виде со стороны верхушки сердца, показана на рисунке 5, б. На рисунке 5, б показаны мышечные слои сердца: наружный слой, средний слой, глубокий слой. Сокращения всех трех слоев суммируются, повышая эффективность выбрасывания крови. Накачка сердца кровью после её выбрасывания в аорты, легочную и венечные осуществляется с помощью синхронного вбрасывания крови из предсердий. Следует отметить, что наличие трех дублирующих слоев сердца повышает его устойчивость при возникновении паталогических изменений, таких как инфаркт миокарда или других повреждений структур сердца.

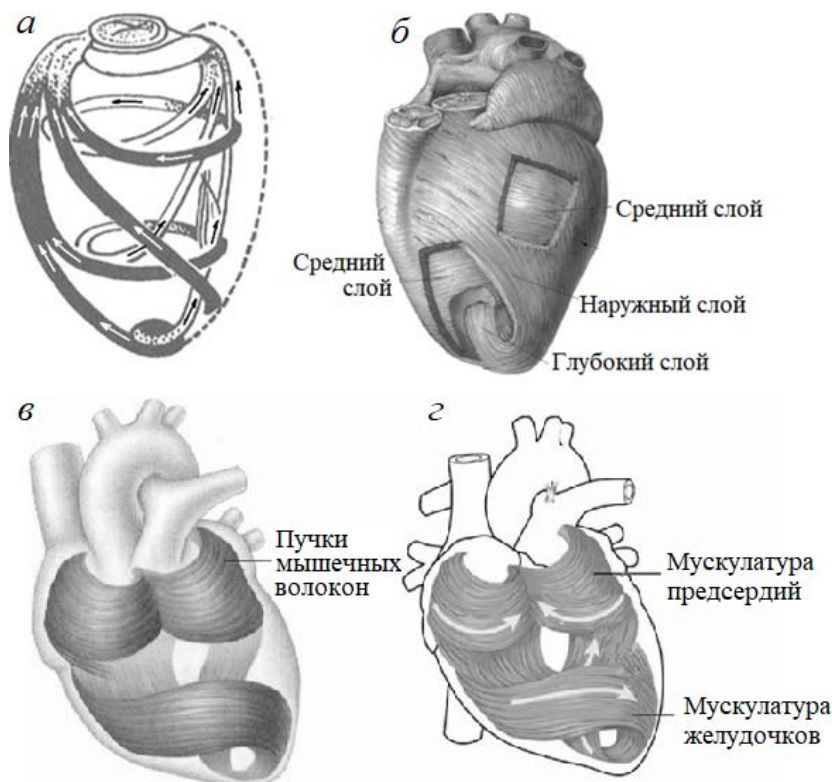


Рисунок 5. (а) Мышечные волокна сердца по спирали спускаются к верхушке сердца, а затем снова поднимаются к его основанию, образуя хиральную систему [18, стр. 89-91]. (б) показано анатомическое строение мышечных волокон сердца. Каждый пучок волокон обвивает желудочки сердца от верхушки до основания, образуя хиральную систему волокон. Мышечные волокна предсердия также образуют хиральную систему, как это видно из рисунков в, г

Механическая работа предсердий также осуществляется за счет реализации вогнутых спиральных автоволн, переносящих энергию и реализуемых мышечной структурой предсердий, что иллюстрируется рисунке 5, в, г.

Движение крови в желудочках сердца похоже на всасывающий центр водоворота, к которому устремляется кровь с периферии со все возрастающей скоростью, чтобы вернуться обратно в более медленном темпе и разойтись по всему телу [18, стр. 89-91]. Мышечные волокна сердца формируют вогнутую волну механического сокращения при отсутствии жесткого скелета в сердце (в сердце имеются только гибкие фиброзные волокна). Внутреннюю эндокардиальную структуру сердца можно сравнить с гибким мешком, стягиваемым хиральной структурой мышечных волокон во время систолы и раздуваемым во время диастолы во время заполнения кровью. Интересно отметить, что при окончании систолы происходит круговое движение, похожее на отжим белья прачкой, что позволяет осуществить более полное изгнание крови из желудочков сердца. Имеется три слоя мышечных волокон, каждый из которых реализует вогнутых спиральных автоволн, переносящих энергию, обеспечивающую выталкивание крови из клапанов, расположенных вблизи предсердий.

Понимание механизма сокращения мускулатуры сердца, происходящего под действием наружного электромеханического возбуждения, может оказаться полезным при лечении инфаркта миокарда. При инфаркте миокарда происходит частичное повреждение мускулатуры сердца из-за частичных кровоизлияний. В зависимости от его локализации повреждений можно прогнозировать план лечения и ликвидацию последствий инфаркта миокарда. Отметим, что изучение макроскопической механической деятельности сердца требует дальнейших экспериментальных и практических исследований.

3.3 Эволюция хиральности при изменении масштаба структур.

Установлено возможность взаимодействия двух хиральных структур. Это приводит к возникновению хиральных структур четвертого порядка и более. Например, при перегибе двух хиральных нитей и соприкосновении ветвей происходит возникновение четыреххиральной системы. Возникновение двойных хиральных механических систем на скрученных нитях иллюстрируется рисунком 6.

Процессы образования многохиральных структур характерны для конформации белков. Белковые молекулы могут образовывать 4 типа хиральных структур. Пример сложной хиральной структуры от первичной до четвертичной, возникающей при конформации белков, показан на рисунке 7.

Вторичная такая структура может сформироваться изначально от природы либо при воздействии на первичную температурой или иными условиями. Данная конформация имеет три разновидности: ровные, правильные, стереорегулярные витки, построенные из остатков аминокислот, которые закручиваются вокруг основной оси соединения. Причем строение считается правильным из-за того, что витки равномерно повторяются через каждые 4 звена. Такая структура может быть как левозакрученной, так и правозакрученной. Но в большинстве известных белков преобладает правовращающий изомер. Такие конформации принято называть альфа-структурами. Есть одна особенность, которую должен проявлять белок. Строение аминокислот на ответвлениях должно быть максимально коротким, как у глицина или аланина, например. Этот тип вторичной конформации носит название бета-листов за способность будто слипаться при образовании общей структуры. Относящееся к третьему типу строение белка биология обозначает как сложные, разноразбросанные, неупорядоченные фрагменты, не обладающие стереорегулярностью и способные изменять структуру под воздействием внешних условий.



Рисунок 6. Возникновение двойных хиральных механических систем на скрученных нитях

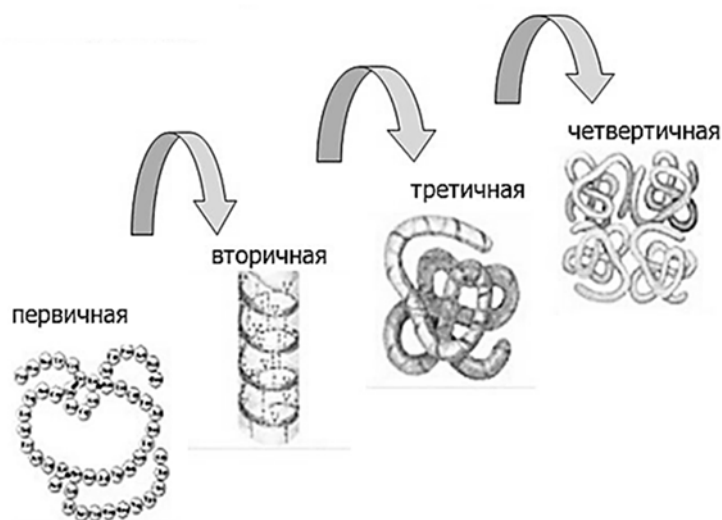


Рисунок 7. Хиральные структуры от первичной до четвертичной, возникающие при конформации белков

3.4 Влияние начальных условий на возникновение хиральности.

Установлено, что характер хиральности правой или левой зависит от установки начальных условий. Поскольку начальные условия можно установить произвольно, то и тип хиральности будет определяться начальными условиями.

Биологам удалось научиться управлять направлением закрутки панциря улитки *Lymnaea stagnalis*, то есть хиральностью при помощи физического воздействия. При этом генетическая предрасположенность к той или иной ориентации оказалась неважна. При помощи тонких стеклянных штырей исследователи смогли расположить зародыш на восьмиклеточной стадии так, чтобы добиться нужной им хиральности.

При этом результат опыта не зависел от экспрессии гена *nodal*, который, как считается, определяет направление закрутки. Биологи подчеркивают, что изменение направления закрутки панциря приводило к полной перестройке программы развития улитки, то есть из опытного зародыша вырастала полноценная улитка с правильным для данной хиральности расположением органов.

По словам ученых, новое исследование показывает, что корни геометрической симметрии того или иного организма лежат не только в генетике, но и в обычной механике расположения организма во время развития.

3.5 Реализация свойств молекулярных хиральных систем в виде энергоемких упругих закрученных нитей, обладающих запасом свободной энергии и элементами хиральной асимметрии.

Эволюция молекулярных хиральных систем была изучена в работе проф. В.А. Твердислова и его школы [3-10]. Была сконструирована периодическая таблица знакопеременных иерархий хиральных (спиральных) структур от первичной до четвертичной для ДНК и белков. Были рассмотрены L – левые конфигурации энантиомера или спирали и D – правые конфигурации [3-10]. Более подробно периодические свойства молекулярных структур изучены в работах проф. В.А. Твердислова и его школы [3-10].

Заключение.

Экспериментальные наблюдения показывают, что механизмы хиральности и хиральные свойства являются инвариантными как для макроскопических, так и для микроскопических объектов. Хиральные системы обладают рядом замечательных свойств, позволяющих реализовать самоорганизацию в сложных системах. В данной работе рассмотрены свойства хиральных систем на примере энергоемких упругих закрученных нитей,



Рисунок 8. Искусственно созданные хирально-симметричные улитки *Lymnaea stagnalis*

обладающих запасом свободной энергии и элементами хиральной асимметрии. Установлен ряд физических свойств макроскопических хиральных систем. Установлено, что многие свойства хиральности для макроскопических механических систем наблюдаются и на молекулярном уровне.

Хиральные свойства могут проявляться при эволюции автоволновых процессов в активных средах в виде структур типа синхронизированных спиральных автоволн, диссипативных структур и ряда других динамических процессов. Более подробно эти процессы описаны, например, в работах [13-16]. Динамические хиральные структуры требуют отдельного изучения, что предполагается сделать в дальнейшем.

Список литературы / References:

1. Аветисов В.А., Гольданский В.И. Физические аспекты нарушения зеркальной симметрии биоорганического мира. *УФН*, 1996, т. 166, №8, с. 873-891. [Avetisov V.A., Goldansky V.I. Physical aspects of violation of mirror symmetry of the Bioorganic world. *UFN*, 1996, vol. 166, no. 8, pp. 873-891. (In Russ.)]
2. Блюменфельд Л.А., *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики*. Еditorиал УРСС, М., 2002. [Blumenfeld L.A., *Solvable and unsolvable problems of biological physics*. Editorial URSS, M., 2002. (In Russ.)]
3. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. От автоволновых механизмов самоорганизации к молекулярным машинам. *Изв. РАН. Сер. физ.*, 2015, т. 79 (3), с. 1728. [Tverdislov V.A., Malysheko E.V., Ilchenko S. A. From autowave mechanisms of self-organization to molecular machines. *Izv. RAN. Ser. phis.*, 2015, vol. 79 (3), 1728 p. (In Russ.)]
4. Гольданский В.И., Кузьмин В.В. Спонтанное нарушение зеркальной симметрии в природе и происхождение жизни. *Успехи физ. наук*, 1989, т. 157 (1), с. 3. [Goldansky V.I., Kuzmin V.V. Spontaneous disruption of mirror symmetry in nature and the origin of life. *Uspekhy phiz. nauk*, 1989, vol. 157 (1), 3 p. (In Russ.)]
5. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Ивлиева А.А. и Твердислова И.Л. Ионная и хиральная асимметрии как физические факторы биогенеза и онтогенеза. *Вестн. МГУ. Сер. 3. Физика, астрономия*, 2011, № 2, с. 3. [Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Ivlieva A.A., Tverdislova I.L. Ionic and chiral asymmetries as physical factors of biogenesis and ontogenesis. *Vestn. MGU. Ser. 3. Phizika, astronomiya*, 2011, no. 2, p. 3. (In Russ.)]
6. Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Яковенко Л.В. От симметрий – к законам эволюции. I. хиральность как инструмент стратификации активных сред. *Биофизика*, 2012, т. 57 (1), с. 146. [Tverdislov V.A., Sidorova A.E., Yakovenko L.V. From symmetries – to the laws of evolution. I. chirality as an instrument of stratification of active media. *Biophizika*, 2012, vol. 57 (1), 146 p. (In Russ.)]
7. 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. *Biophizika*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 159-164. (In Russ.)]
8. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Мазуров М.Е., Калужный И.М. Автоволновая модель образования везикул на поверхности океана. *Вестник МГУ. Сек. 3. Физика. Астрономия*, 2014, № 6, с. 107-109. [Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Mazurov M.E., Kalyuzhny I.M. Autowave model of vesicle formation on the ocean surface. *Vestnik MGU. Sek. 3. Phizika. Astronomiya*, 2014, no. 6, pp. 107-109. (In Russ.)]
9. Стовбун С.В., Скоблин А.А., Твердислов В.А. Экспериментальное наблюдение синергетической закономерности смены знака хиральности в иерархиях биомиметических структур. *Биофизика*, 2014, т. 59 (6), с. 1079. [Stovbun S.V., Skoblin A.A., Tverdislov V.A. Experimental observation of synergetic regularity of chirality sign change in hierarchies of biomimetic structures. *Biophizika*, 2014, vol. 59 (6), p. 1079. (In Russ.)]
10. Стовбун С.В., Михалева М.Г., Скоблин А.А., Твердислов В.А. Структурообразование в хиральных системах. *Супрамолекулярные струны*. под ред. В.А. Твердислова (Физический факультет МГУ, М.), 311 с. [Stovbun S.V., Mikhaleva M.G., Skoblina A.A., Tverdislov V.A. structure Formation in chiral systems. *Supramolekulyarniye struny*, ed. V. A. Tverdislov (faculty of Physics, Moscow state University), 311 p. (In Russ.)]
11. Намиот В.А., Ботьяновский А.В., Филатов И.В. и др. Дальнедействующие взаимодействия и принципы молекулярного узнавания на разных уровнях строения биосистем. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 1, с. 54-59. [Namiot V.A., Botyanovsky A.V., Filatov I.V. et al. long-Range interactions and principles of molecular recognition at different levels of Biosystems structure. *Biophizika*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 54-59. (In Russ.)]
12. Шайтан К.В., Ложников М.А., Кобельков Г.М. Релаксационный фолдинг и принцип минимума скорости диссипации энергии для конформационных движений в вязкой среде. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 4, с. 629-637. [Shaitan K.V., Lozhnikov M.A., Kobelkov G.M. Relaxation folding and the principle of minimum energy dissipation rate for conformational movements in a viscous medium. *Biophizika*, 2016, vol. 61, no. 4, pp. 629-637. (In Russ.)]
13. Мазуров М.Е. Нелинейные вогнутые спиральные автоволны и их приложения. *Изв. РАН. Сер. Физ.*, 2018, т. 82, №1. [Mazurov M.E. Nonlinear concave spiral autowaves and their applications. *Izv. RAN. Ser. phis.*, 2018, vol. 82, no. 1. (In Russ.)]
14. Мазуров М.Е., Калужный И.М. Автоволны кругового типа в предсердиях человека и начальные условия для их возникновения. *Вестник МГУ. Серия Физика*, 2014, № 3, с. 45-49. [Mazurov M. E., Kaluzhny I.M. The Waves with circular action in Atria of human and initial conditions for their occurrence. *Vestnik MGU. Seriya Phizika*, 2014, no. 3, pp. 45-49. (In Russ.)]
15. Мазуров М.Е., Твердислов В.А. Механизм самоорганизации в поверхностном микрослое воды с использованием термокапиллярной конвекции. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 6, с. 1068-1072. [Mazurov M.E., Tverdislov V.A. Mechanism of self-organization in the surface micro-layer of water using thermocapillary convection. *Biophizika*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 1068-1072. (In Russ.)]

16. Мазуров М.Е. *Идентификация математических моделей нелинейных динамических систем*. М.: Ленанд, 2019, 284 с. [Mazurov M. E. *Identification of mathematical models of nonlinear dynamical systems*. M.: Lenand, 2019, 284 p. (In Russ.)]
17. Ваняг В.К. *Диссипативные структуры в реакционно-диффузионных системах: Эксперимент и теория*. РХД, 2008, 300 с. [Vanag V.K. *Dissipative structures in reaction-diffusion systems: Experiment and theory*. RCD, 2008, 300 p. (In Russ.)]
18. Швенк Т. *Чувствующий хаос. Образование движущихся форм в воде и воздухе*. Москва: Новый центр, 2003, 216 с. [Schwenk T. *The Sense of chaos. Formation of moving forms in water and air*. Moscow: New center, 2003, 216 p. (In Russ.)]

ABOUT MECHANISMS OF CHIRALITY OF MACROSCOPIC SYSTEMS

Tverdislov V.A., Mazurov M.E., Yakovenko L.V.

M.V. Lomonosov Moscow State University

Moscow, 119991, Russia; e-mail: mazurov37@mail.ru

Abstract. It is established that the chirality mechanisms and chiral properties are invariant for both macroscopic and microscopic objects. Chiral systems have a number of remarkable properties that allow self-organization in complex systems. In this paper, the properties of chiral systems are examined by the example of energy-intensive elastic twisted filaments with a free energy reserve and elements of chiral asymmetry. The following properties of macroscopic chiral systems are established: the effect of elasticity during bending of the thread, the less the elasticity in bending, the smaller the step of the double helix and vice versa; it is permissible to twist three, four or more elastic threads, there are no restrictions. The strength of a system of several twisted threads increases with an increase in the number of twisted threads; chiral systems are energy storage devices; there is the possibility of the growth of "whiskers" in the chiral system; the need for the existence of "locks" in chiral structures connecting individual twisted strands of the chiral system; the influence of the initial conditions on the occurrence of chirality; scale invariance of the scaling evolution of chiral systems takes place. Many chirality properties for macroscopic mechanical systems also occur at the molecular level.

Key words: macroscopic chiral systems, energy-intensive twisted threads, energy accumulators, chiral system locks, large-sca.

КВАНТОВОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ДВУХ ТАУТОМЕРНЫХ ФОРМ КАРНОЗИНА С КОБАЛЬТОМ

Демухамедова С.Д.

Институт физических проблем, Бакинский государственный университет
ул. 3. Халилова, 23, AZ 1148, г. Баку, Азербайджан; e-mail: svetlanabest@mail.ru
Поступила в редакцию: 22.08.2019

Аннотация. В работе методами молекулярной механики ММ⁺ и полуэмпирическим методом квантовой химии PM3 исследовано пространственное и электронное строение комплексов, состоящих из молекулы карнозина с одним ионом кобальта Co(II) или Co(III). Изучено влияние атома кобальта на геометрические и энергетические параметры комплексов в обоих таутомерных формах имидазольного кольца карнозина N¹H и N³H. В изученных комплексах N¹H+Co+H и N³H+Co+H, атом Co(II) соединяется координационной связью с одним из атомов азота имидазольного кольца. Для комплекса карнозина с ионом Co(III) выбрана структура, где атом кобальта имеет координационное число четыре и образует хелатное кольцо из семи связей. Показано энергетическое предпочтение комплексов с таутомерной формой N³H. Более стабилен комплекс карнозина в таутомерной форме N³H с ионом кобальта Co(III), атом азота имидазольного кольца которого является донором электронов. Был исследован также комплекс, состоящий из четырех молекул карнозина, координированный двумя ионами кобальта, соединенными кислородным мостиком и молекулами воды. В процессе связывания каждый атом кобальта образует координационные полости в виде двух шестичленных хелатных колец и имидазольного кольца карнозина, имеющего общую координационную связь с хелатным кольцом. Этот комплекс оказался наиболее энергетически стабильным.

Ключевые слова: карнозин, комплексы, кобальт, квантово-химические расчеты, структура.

Карнозин (β-аланин–L-гистидин) – природный дипептид, выполняющий важные биологические функции, содержится в различных тканях организма. Он синтезируется с помощью фермента карнозин-синтетазы в строго определенных органах, в частности в головном мозге, хрусталиках глаз, сердце, скелетных мышцах, почках, коже и слизистой желудка и играет решающую роль для сохранения оптимальной структуры и функций этих органов [1]. Карнозин является сильным антиоксидантом благодаря его способности защищать клетки и ткани организма от окисления активными формами кислорода. Антиоксидантные свойства карнозина обеспечивают его успешное применение при лечении различных воспалительных процессов, протекающих на фоне повреждения клеточных мембран [2]. Уменьшение с возрастом активности карнозин-синтетазы определяет старение организма, однако карнозин противодействует этому процессу благодаря тому, что защищает клетки и ткани организма от окисления активными формами кислорода. Карнозин не токсичен и при длительном применении не накапливается в органах, поэтому может быть рекомендован пациентам, как натуральное высокоэффективное средство, не имеющее побочных эффектов [3]. В обзоре [4] обсуждаются некоторые доказательства клинических и фундаментальных исследований для использования карнозина в качестве лекарственной терапии для возрастных заболеваний человека. Карнозин демонстрирует стимуляцию микроциркуляции мозга и мышц, оказывает омолаживающий эффект, успешно используется для лечения пациентов после инсульта, предотвращает и уменьшает такие нейродегенеративные патологии, как боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, используется для профилактики и лечения старческого слабоумия [5], защищает сердечные миоциты от перекисного окисления липидов [6], применяется для лечения диабета [7]. Карнозин обладает способностью выступать в качестве лиганда при образовании координационных комплексов с различными атомами металлов, поэтому многие его биохимические свойства зависят от участия определенных катионов металлов. Обзор различных комплексов карнозина с атомами переходных металлов дан в работе Бэран [8]. Интерес к карнозину, его производным и различным комплексам, в которых в качестве лиганда выступает молекула карнозина продолжает возрастать, так как на их основе возможно создание новых лекарственных препаратов широкого спектра действия. Все вышесказанное подтверждает необходимость дальнейшего исследования молекулярного механизма карнозина, его аналогов и их комплексов с различными металлами.

В настоящее время методы молекулярного моделирования приобретают все большую значимость в различных областях научных исследований. Современные вычислительные методы компьютерного моделирования позволяют решать задачи, недоступные экспериментальным методам исследования и широко используются при изучении биохимических процессов, протекающих в живой клетке, в исследованиях биологических молекул и поиске новых лекарств на их основе. Наиболее точными считаются квантовохимические методы расчета, позволяющие найти равновесные геометрические параметры, изучить электронную структуру, поверхность потенциальной энергии, оптические спектры. Ранее нами были изучены пространственные и электронные структуры карнозина в двух его таутомерных формах N¹H и N³H и их комплексы с атомами цинка и меди [9-11]. Карнозин образует также комплексы с кобальтом [12-19] – одним из важнейших микроэлементов, участвующих в кроветворении. Кобальт задействован в процессах образования эритроцитов и гемоглобина. Кроме того, он является основным исходным материалом при синтезе витамина B₁₂

полезной микрофлорой пищеварительного тракта. В наибольших количествах кобальт содержится в поджелудочной железе, что предполагает его участие в образовании инсулина. В последние годы продолжают активно исследовать комплексы кобальта с гистидиновыми лигандами [20, 21]. Особенно надежным союзником врачей за жизнь людей оказался радиоактивный кобальт. Крупницы изотопа кобальт-60, помещенные в медицинские “пушки”, не причиняя вреда организму человека, бомбардируют гамма-лучами внутренние злокачественные опухоли, губительно влияя на быстро размножающиеся больные клетки, приостанавливая их деятельность и тем самым ликвидируя очаги страшной болезни. Так как карнозин образует комплексы с кобальтом, целью нашей работы стало исследование различных возможных комплексов карнозина с ионом этого микроэлемента с возможностью дальнейшего использования таких комплексов в создании лекарственных препаратов нового поколения.

В данной работе методами теоретического моделирования исследованы комплексы известного природного дипептида карнозина в двух его известных таутомерных формах N^1H и N^3H с ионами $Co(II)$ и $Co(III)$. Расчеты проводились с использованием программы HyperChem.8.06. Предварительно геометрические и энергетические параметры комплексов карнозина с атомами кобальта $Co(II)$ и $Co(III)$ рассчитывались в потенциалах полуэмпирического поля MM+ метода молекулярной механики. Оптимизация геометрии проводилась при помощи алгоритма Polak-Ribiere с точностью 0,001 ккал/моль. Полученные координаты равновесных конфигураций ядер были положены в основу расчета полуэмпирическим квантово-химическим методом PM3.

В литературе встречается много работ, посвященных изучению комплексов карнозина с кобальтом II с различной координацией хелатирования. В работе [12] исследовалась скорость комплексообразования в реакции карнозина с $Co(II)$ при образовании семичленной кольцевой системы. Образование комплекса между нейтральной молекулой (в виде цвиттериона) и кобальтом (II) комплекса включало хелатирование через имидазольное кольцо и карбоксильную группу карнозина. Поскольку известно, что кобальт в высоких концентрациях находится в почках и фермент карнозидаза проявляет высокую активность в почках, а субстрат этого фермента карнозин образует комплекс с кобальтом, в работе [13] исследовали способность комплексов карнозина с $Co(II)$ связывать молекулярный кислород. Спектры ЭПР показали, что ион $Co(II)$ (II) и L-карнозин образуют два разных комплекса при смешивании в водном растворе при pH 7,2. Один комплекс имеет координацию N-3 имидазольного кольца с $Co(II)$ и образуется, когда концентрация пептида превышает концентрацию $Co(II)$. Второй комплекс имеет хелатирование трех атомов азота одного карнозина и производит обратимый кислородный носитель путем получения стабильных смешанных хелатов с дополнительным карнозином или гистидином.

В нашей работе исследовались комплексы карнозина $N^1H+Co+H$ и $N^3H+Co+H$, где атом кобальта $Co(II)$ соединяется координационной связью с одним из атомов азота имидазольного кольца. На рисунке 1 представлены расчетные модели комплексов иона кобальта $Co(II)$ с молекулой карнозина с таутомерной формой N^1H (а) и N^3H (б) после оптимизации методом PM3. Комплексообразование карнозина приводит к существенному понижению энергии (табл. 3). При образовании комплекса карнозина $N^1H+Co+H$ полная энергия понижается на 18548,4 ккал/моль по сравнению со свободной молекулой карнозина с таутомерной формой N^1H , а при образовании комплекса $N^3H+Co+H$ полная энергия понижается на 18649,9 ккал/моль по сравнению со свободной молекулой карнозина N^3H . Таким образом, если свободные молекулы карнозина с разной формой имидазольного кольца энергетически не имеют предпочтения, их энергии отличаются всего на 0,1 ккал/моль, то при образовании их комплексов с кобальтом разность энергий между комплексами карнозина $N^1H+Co+H$ и $N^3H+Co+H$ составляет 101,6 ккал/моль, что указывает на существенно большую стабильность комплекса с атомом $Co(II)$ с формой имидазольного кольца N^3H .

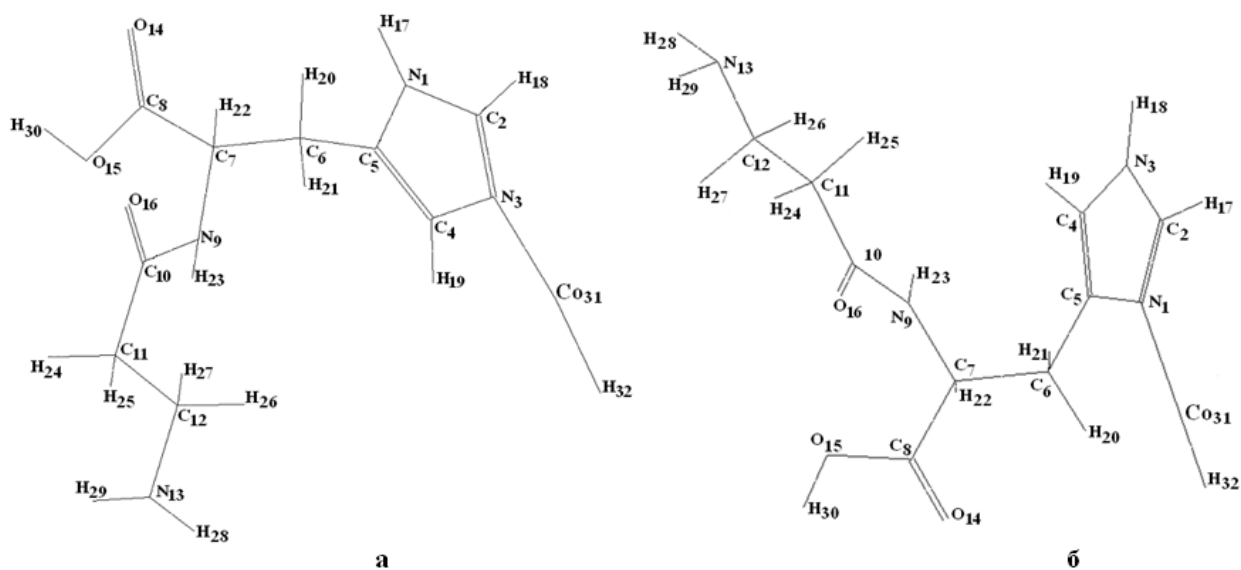


Рисунок 1. Модели комплексов молекулы карнозина в двух таутомерных формах N^1H (а) и N^3H (б) с $Co(II)$ после оптимизации методом PM3

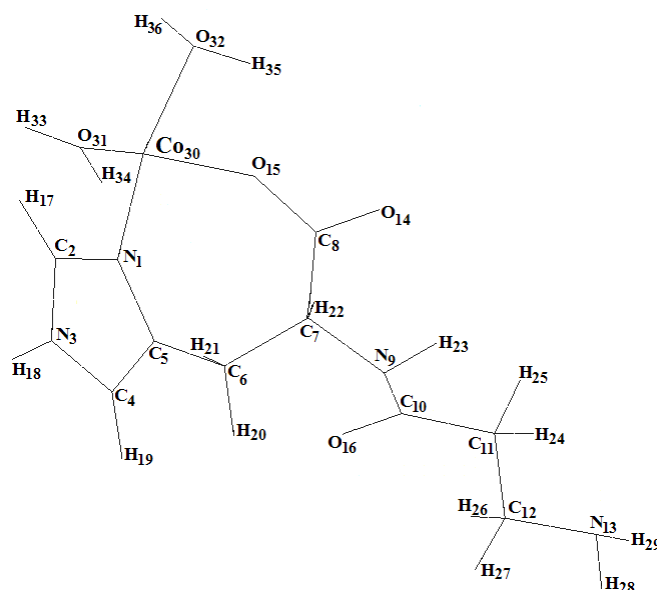


Рисунок 2. Модель комплекса молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H с $Co(III)$ после оптимизации методом РМЗ

В таблице 2 показано распределение зарядов на атомах комплексов таутомерных форм карнозина N^1H и N^3H с атомом кобальта $CoII$, координированного с атомом водорода в единицах заряда. В комплексе $N^1H+CoII+H$ при оптимизации методом РМЗ наибольшее перераспределение зарядов наблюдается в имидазольном кольце карнозина. Самое сильное изменение происходит на атоме $N1(-0,121)$, на который перетекает электронная плотность с близлежащих атомов $C2(0,072)$ и $C5(0,079)$. Также сильное изменение в зарядовом распределении наблюдается на атомах $Co(-0,06)$, и $O15(-0,04)$. В комплексе $N^3H+CoII+H$ оптимизация методом РМЗ также приводит к значительному перераспределению зарядов на атомах имидазольного кольца. Наибольшее изменение затрагивает атом азота $N3(-0,171)$, на который перетекает электронная плотность с близлежащих атомов кольца $C2(0,126)$ и $C4(0,109)$. Атом $N1(0,065)$ отдал электронную плотность атому $Co(-0,053)$. Следует отметить значительное изменение заряда на атомах цепи $C6(-0,140)$ и $C7(0,115)$, происходящее, по-видимому, в результате полученной конфигурации структуры комплекса, при которой атом кобальта подходит довольно близко к атомам $C6$ цепочки и взаимодействует с атомом водорода $H20$, соединенного с атомом $C6$.

Механизм образования комплексов карнозина с ионом $Co(III)$ рассматривается в работе [14], в которой с помощью рентгеноструктурного исследования определена кристаллическая структура пептидного комплекса карнозин- $Co(III)$ и молекулы воды, состоящего из двух пятичленных хелатов вокруг кобальта и координирующегося через атом азота N пептидной группы, атом кислорода O карбоксильной группы и атом азота N имидазольного кольца, однако аминогруппа не координирована с кобальтом. В работе [15] комплексы карнозина с кобальтом (III) охарактеризованы основе спектров ^{13}C ЯМР, УФ и видимого поглощения и кругового дихроизма - карнозин координируется с ионом кобальта III в виде квадридентатного лиганда. С помощью спектров кругового дихроизма исследован механизм расщепления пептидной связи карнозина, индуцированный комплексами $CoIII$ -амин [16], образуя свободную молекулу β -аланила и катионный фрагмент $Co(III)$ – гистидин. В работах Torregiani [17-19] исследуются комплексы карнозина с кобальтом с помощью ИК- и КР-спектроскопии. Исследуя комплексы $CoII$ -карнозин получена информация о кислородном мостике [17], но при увеличении концентрации кобальта в системе $Co(II) / \text{Карнозин} \sim 2:1$ кислород связывается в меньшей степени. В координационных центрах каждый ион $Co(II)$ в комплексах связан с одним атомом кислорода и четырьмя атомами азота: N^1 и N^3 имидазольных колец двух молекул карнозина, азотом пептидной группы и концевым атомом азота аминной группы. На основе ИК и КР спектров предложены структуры комплексов карнозина с $CoII$ и $CoIII$ [18].

В наших расчетах для комплекса, образованного карнозином с атомом $Co(III)$ была выбрана структура, предложенная в работе [18], где атом кобальта имеет координационное число четыре и образует хелатное кольцо из семи связей. Две из четырех координационных связей $Co(III)$ соединяются с атомом азота N^1 имидазольного кольца и атомом кислорода пептидной группы карнозина, а две оставшиеся свободными координационные связи соединяются с молекулами воды. На рисунке 2 приведена расчетная модель комплекса молекулы карнозина в таутомерной форме N^3H после оптимизации методом РМЗ с ионом $Co(III)$. Как видим, образованное семичленное хелатное кольцо имеет общую связь с имидазольным кольцом $N1-C5$. Атом $Co(III)$ координируется с атомом N^1 имидазольного кольца карнозина таутомерной формы N^3H и атомом кислорода $O15$ карбоксильной группы.

Таблица 1. Геометрические параметры комплекса карнозина с CoIII

Длины связей					
N1-Co30	1,82	N1-C2	1,36	N9-C10	1,44
N1-C5	1,41	C2-N3	1,34	C10-C11	1,52
C5-C6	1,49	N3-C4	1,40	C11-C12	1,52
C6-C7	1,54	C4-C5	1,39	C12-N13	1,48
C7-C8	1,55	Co30-O31	2,06	C8-O14	1,23
C8-O15	1,31	Co30-O32	1,94	C10-O16	1,22
O15-Co30	1,95	C7-N9	1,49		
Валентные углы					
N1-C2-N3	106,782	N 1-C5-C6	125,347	C7-C8- O14	124,365
C2-N3-C4	109,353	C5-C6-C7	112,871	N9-C10- O16	120,058
N3-C4-C5	107,198	C6-C7- C8	113,856	C11-C10- O16	123,766
C4-C5-N1	106,569	C7-C8-O15	120,344	N1-Co30-O31	104,125
C5-N1-C2	110,095	C8-O15-Co30	142,797	O15-Co30- O31	93,7109
C4-C5-C6	128,081	O15-Co30-N1	100,32	N1-Co30- O32	168,048
C6-C7-N9	111,808	Co30- N1-C5	135,825	O15-Co30- O32	71,4406
C8-C7-N9	111,617	C10-C11-C12	111,955	O31-Co30- O32	85,3762
C7-N9-C10	122,486	C11-C12- N13	110,265		
N9-C10-C11	116,054	O15-C8- O14	115,231		

В таблице 1 приведены геометрические параметры – длины связей и валентные углы комплекса карнозина таутомерной формы N3H с ионом кобальта Co(III), полученные после оптимизации методом PM3. В образующемся семичленном хелатном кольце длины координационных связей N1-Co = 1,82 Å и Co-O15 = 1,95 Å. С молекулами воды длины координационных связей Co-O ~ 2,0 Å. Остальные длины связи координационной полости N1-C5 = 1,41 Å, C5-C6 = 1,49 Å, C6-C7 и C7-C8 = 1,54 Å, O15-C8 = 1,31 Å. Все связи O-H = 0,96 Å, N-H = 1,0 Å, C-H ~ 1,1 Å.

В таблице 2 показано распределение зарядов на атомах комплекса карнозина в таутомерной форме N³H с атомом кобальта CoIII и двумя молекулами воды в единицах заряда. Наибольшее изменение зарядового распределения при оптимизации методом PM3 наблюдается на атоме кобальта CoIII (0,318), который отдает свою электронную плотность атомам кислорода и атому азота N1, соединенным с кобальтом координационными связями: O15 (-0,3), O31 (-0,18), O32 (-0,1) и N1 (-0,1). На атом N3 (-0,08) перетекает электронная плотность с атомов имидазольного кольца C2 (0,11), C4 (0,041) и C5 (0,046). Перераспределение зарядов наблюдается также в карбонильной группе C8 (0,065) и O14 (0,065).

Таблица 2. Заряды на атомах комплексов карнозина с кобальтом

	N1H+CoII+H			N3H+CoII+H			N3H+CoIII+2H2O		
Atom	до PM3	после PM3	Δ	до PM3	после PM3	Δ	до PM3	после PM3	Δ
Co	-0,145	-0,206	-0,061	-0,159	-0,212	-0,053	-0,592	-0,274	0,318
C 2	-0,417	-0,345	0,072	-0,416	-0,290	0,126	-0,548	-0,438	0,110
N 3	0,331	0,326	-0,005	0,478	0,307	-0,171	0,471	0,391	-0,080
C 4	-0,250	-0,263	-0,013	-0,321	-0,212	0,109	-0,313	-0,272	0,041
C 5	-0,295	-0,216	0,079	-0,225	-0,209	0,016	-0,280	-0,234	0,046
C 6	-0,017	-0,025	-0,008	-0,018	-0,158	-0,140	0,005	-0,002	-0,007
C 7	-0,056	-0,049	0,007	-0,060	0,055	0,115	-0,050	-0,076	-0,026
C 8	0,360	0,353	-0,007	0,359	0,362	0,003	0,287	0,377	0,090
N 9	-0,041	-0,044	-0,003	-0,038	-0,056	-0,018	-0,023	-0,048	-0,025
C 10	0,246	0,250	0,004	0,240	0,238	-0,004	0,250	0,261	0,011
C 11	-0,134	-0,122	0,012	-0,133	-0,125	0,008	-0,140	-0,132	0,009
C 12	-0,083	-0,096	-0,013	-0,082	-0,097	-0,015	-0,082	-0,095	-0,013
N 13	-0,039	-0,034	0,005	-0,047	-0,038	0,009	-0,042	-0,035	0,007
O 14	-0,383	-0,379	0,004	-0,372	-0,387	-0,015	-0,397	-0,462	0,065
O 15	-0,266	-0,307	-0,041	-0,272	-0,262	0,010	-0,214	-0,506	-0,296
O 16	-0,367	-0,363	0,004	-0,362	-0,344	0,018	-0,380	-0,372	0,008
N 1	0,482	0,362	-0,121	0,339	0,274	0,065	0,539	0,433	-0,106
O 31							-0,052	-0,235	-0,183
O 32							-0,093	-0,193	-0,100

Таблица 3. Энергетические параметры карнозина и его комплексов с кобальтом

Карнозин и его комплексы с Zn	Энергетические параметры, ккал/моль				μ , D
	$E_{\text{полн.}}^*$	$E_{\text{эл.}}$	$E_{\text{от.}}$	$E_{\text{св.}}$	
Карнозин N ¹ H	-64839,5	-402729,6	337890,1	-2976,7	2,6
Карнозин N ³ H	-64839,6	-403028,3	338188,7	-2976,8	5,8
Карнозин N ¹ H с CoII+H до PM3	-83352,7	-480413,4	397060,65	-3256,3	9,6
Карнозин N ¹ H с CoII+H после PM3	-83387,9	-475758,3	392370,4	-3291,5	7,8
Карнозин N ³ H с CoII+H до PM3	-83357,7	-485152,2	401794,5	-3261,2	11,9
Карнозин N ³ H с CoII+H после PM3	-83489,5	-495544,7	412055,2	-3393,0	8,0
Карнозин N ³ H с CoIII до PM3	-97612,0	-617490,5	519878,6	-3567,5	11,8
Карнозин N ³ H с CoIII после PM3	-97753,6	-608966,1	511212,5	-3709,1	9,0
4carn+2CoII+2O+2H ₂ O до PM3	-325621,2	-5050967,3	4725346,1	-13203,7	9,5
4carn+2CoII+2O+2H ₂ O после PM3	-326073,7	-4992408,9	4666335,2	-13656,2	6,3

В таблице 3 приведены энергетические параметры карнозина и его комплексов с кобальтом, исследованных нами, после оптимизации методом PM3. Как видно из таблицы 3, при образовании комплекса карнозина N³H с атомом трехвалентного кобальта Co(III) энергия комплекса понижается еще на 14264,1 ккал/моль и приводит к образованию более устойчивого комплекса. По сравнению со свободной молекулой карнозина N³H энергия при образовании этого комплекса понижается на 32914,0 ккал/моль. Образование координационных комплексов карнозина приводит к перераспределению электронной плотности в обоих таутомерных формах карнозина. В комплексе карнозина с Co(III) согласно результатам проведенного расчета донором электронов в комплексе карнозина с таутомерной формой N³H является атом кобальта CoIII. Влияние кобальта распространяется на все атомы хелатного кольца.

Нами был исследован также комплекс карнозина с кобальтом (II), состоящий из четырех молекул карнозина (две молекулы карнозина с таутомерной формой N¹H и две – с таутомерной формой N³H), координированный двумя атомами кобальта, соединенными кислородным мостиком O16-O17. На рисунке 3 представлена модель этого комплекса после оптимизации методом PM3. В процессе связывания каждый атом кобальта образует замкнутые координационные полости в виде трех соединенных общими связями колец – двух шестичленных и имидазольного кольца молекулы карнозина в таутомерной форме N³H. На рисунке 4 на модели комплекса, для наглядности представленного без молекул водорода, показаны длины связей комплекса, полученные после оптимизации методом PM3.

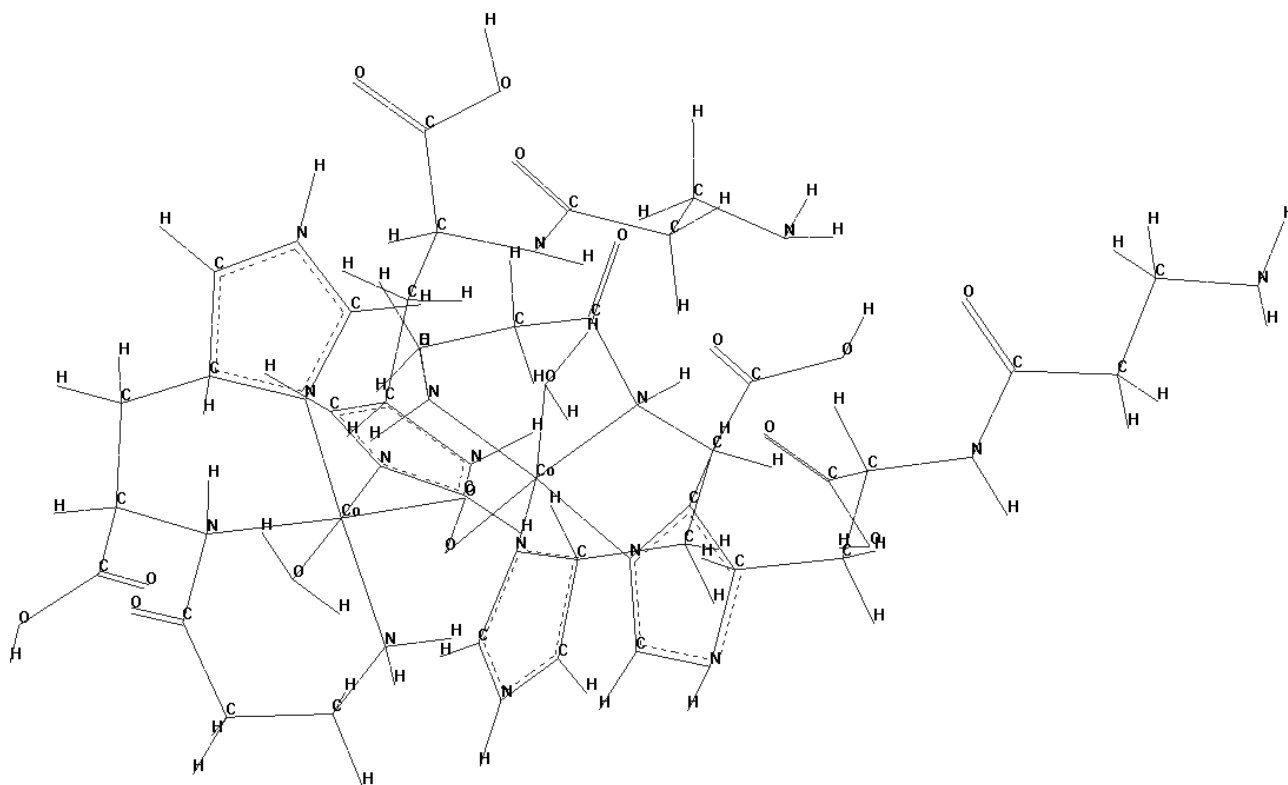


Рисунок 3. Модель комплекса 4-х молекул карнозина с двумя ионами Co (II), кислородами и молекулами воды после оптимизации методом PM3

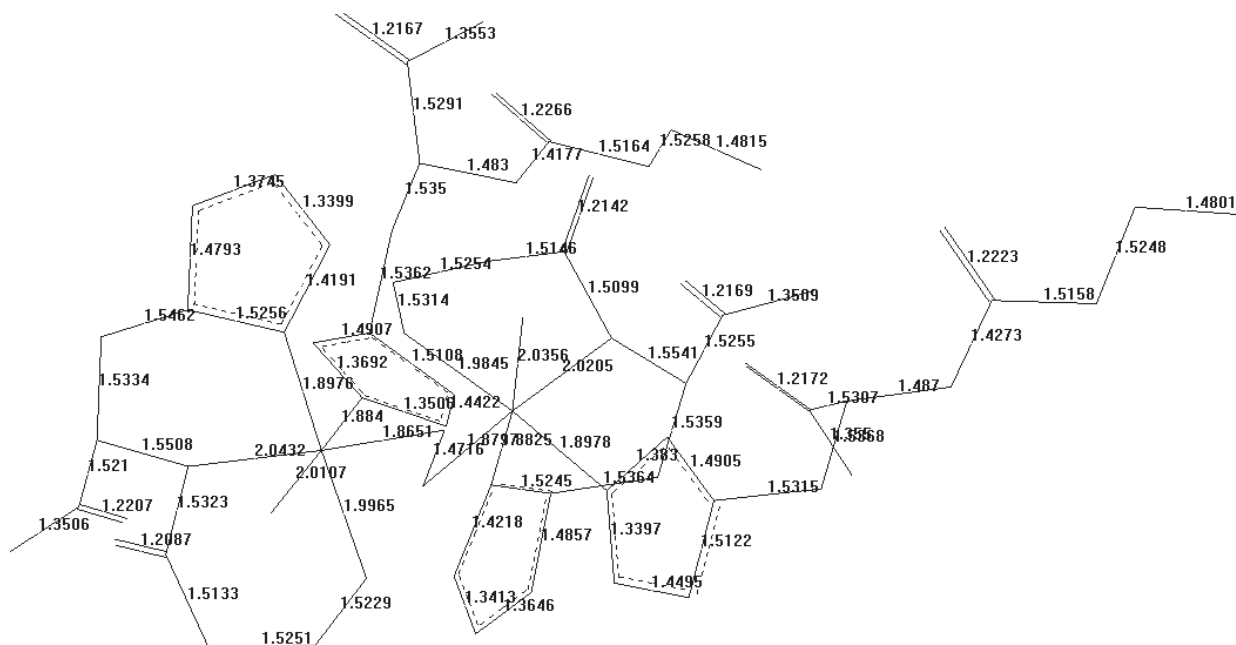


Рисунок 4. Длины связей молекулы карнозина, состоящей из 4-х молекул карнозина с двумя ионами Co (II), кислородами и молекулами воды после оптимизации методом PM3 (атомы водорода не показаны).

На рисунке 5 показан активный центр комплекса, на котором хорошо видны координационные полости, образованные хелатированием четырех молекул карнозина двумя атомами кобальта.

Молекулы карнозина с таутомерной формой N^1H соединяются с кобальтами только через атом N^3 своего имидазольного кольца. Таким образом, каждый атом кобальта координируется с тремя атомами азота молекулы карнозина N^3H и с одним атомом азота N^1H молекулы карнозина N^1H . Также каждый атом кобальта координируется с молекулой воды и атомом кислорода мостика, соединяющего два атома кобальта. Атом Co18 образует координационные связи с атомами азота имидазольных колец двух молекул карнозина N35 и N43, а Co33 связывается с атомами N21 и N31 имидазольных колец двух других молекул карнозина. Co18 и Co33 связываются с молекулами воды через атомы кислорода O48 и O51. Координационные полости имеют общие связи Co18-N2 и N35-C36 в одной полости и Co33-N66 и N21-C20 в другой.

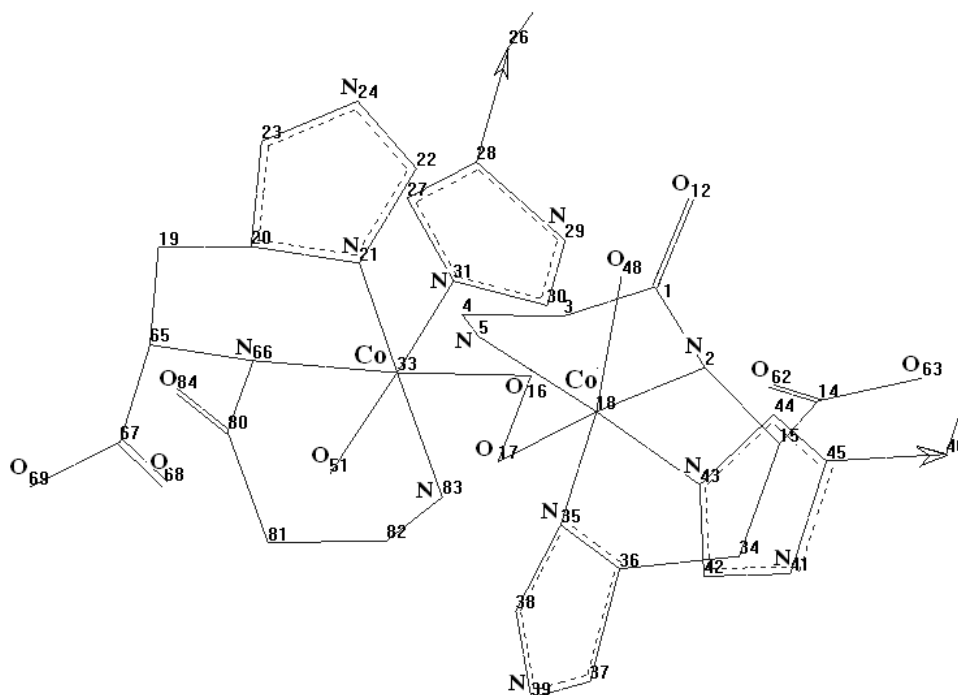


Рисунок 5. Активный центр комплекса 4-х молекул карнозина с двумя ионами Co (II), кислородами и молекулами воды после оптимизации методом PM3 (атомы водорода не показаны)

Таблица 4. Распределение зарядов на атомах комплекса 4карнозина+2CoII+2O₂+2H₂O

Атом	До РМ3	После РМ3	Атом	До РМ3	После РМ3	ΔРМ3
Co18	-0,241	-0,241	Co 33	-0,285	-0,240	-
O 17	-0,400	-0,337	O 16	-0,324	-0,249	-0,088
O 48	-0,152	-0,249	O 51	-0,159	-0,278	-0,029
N 2	0,298	0,236	N 66	0,324	0,192	-0,044
C 1	0,145	0,202	C 80	0,165	0,201	-
O 12	-0,254	-0,278	O 84	-0,245	-0,253	0,025
C 3	-0,135	-0,125	C 81	-0,121	-0,114	0,011
C 4	-0,187	-0,176	C 82	-0,203	-0,186	-0,010
N 5	0,326	0,363	N 83	0,315	0,341	-0,022
C 15	-0,138	-0,101	C 65	-0,154	-0,107	-
C 34	-0,238	-0,143	C 19	-0,231	-0,153	-0,010
C 36	0,073	0,089	C 20	0,074	0,094	-
N 35	0,081	-0,118	N 21	0,102	-0,128	-0,010
C 37	-0,725	-0,740	C 23	-0,793	-0,807	-0,067
N 39	0,544	0,720	N 24	0,549	0,668	-0,052
C 38	-0,480	-0,550	C 22	-0,429	-0,456	0,094
C 14	0,346	0,360	C 67	0,367	0,385	0,025
O 62	-0,341	-0,377	O 68	-0,332	-0,375	-
O 63	-0,277	-0,290	O 69	-0,299	-0,293	-
N 43	0,364	0,539	N 31	0,405	0,538	-
C 42	-0,380	-0,487	C 30	-0,508	-0,603	-0,116
N 41	0,072	0,023	N 29	0,146	0,022	-
C 45	0,099	0,038	C 28	0,090	0,044	-
C 44	-0,812	-0,799	C 27	-0,740	-0,708	0,091

Как видим, длины координационных связей в координационной полости хелатируемой атомом кобальта Co33 равны: Co33-N21 = 1,8976 Å, Co33-N66 = 2,0432 Å, Co33-N83 = 1,9965 Å, с другим карнозином Co33-N31 = 1,884 Å, с молекулой воды Co33-O = 2,0107 Å и с атомом кислорода кислородного мостика Co33-O16 = 1,8651 Å. Длины координационных связей в координационной полости, хелатируемой другим атомом кобальта Co18: Co18-N35 = 1,8825 Å, Co18-N2 = 2,0205 Å, Co18-N5 = 1,9845 Å, со вторым карнозином Co33-N43 = 1,8978 Å, с молекулой воды Co33-O48 = 2,0356 Å и с кислородным мостиком Co-O17 = 1,8797 Å. Длина кислородного мостика, соединяющего два атома кобальта O16-O17 = 1,4716 Å.

В таблице 5 представлено распределение парциальных зарядов на атомах комплекса из 4-х молекул карнозина с двумя молекулами кобальта, воды и кислорода.

Наибольшая разница в значениях парциальных зарядов соответствующих атомов в двух координационных полостях наблюдается для атомов углеродов, находящихся между двумя атомами азота имидазольных колец молекул карнозина в таутомерной форме N¹H (0,116) – это атомы C42 и C30 и в таутомерной форме N³H (0,094) – это атомы C38 и C22, для атомов кислорода в мостике (0,088) – это атомы O16 и O17 и в атомах углеродов и азотов имидазольных колец молекул карнозина таутомерной формы N³H – это атомы углерода C37 и C23 (0,067) и азоты азота N37 и N24 (0,052).

В таблице 5 приведена заселенность атомных орбиталей атомов координационных связей комплекса из 4-х молекул карнозина с двумя атомами кобальта, воды и кислорода.

Общая заселенность атома кобальта равна 9,23 электрона у каждого атома кобальта. Как видно из таблицы 5, у атомов кобальта наблюдается повышенная заселенность на d-орбиталях и наибольшее изменение заселенностей в процессе оптимизации также приходится на d-орбитали атома CoII. В первой координационной полости на атоме Co18 заселенность уменьшается в основном на орбиталях Dz2 и Dxy ~ 0,23 и увеличивается на орбиталях Dy2 ~ 0,23, на Dxz и Dx2 ~ 0,12. Во второй координационной полости на атоме Co33 наоборот, заселенность в процессе оптимизации увеличивается на орбиталях Dz2 и Dxy ~ 0,12 и уменьшается на орбиталях Dxz (0,04↓), Dy2 (0,11↓) и Dx2 (0,08↓). Распределение и изменение в процессе оптимизации заселенностей атомных орбиталей на других атомах координационных связей наглядно представлено в таблице 5.

Исследованный нами комплекс, состоящий из 4-х молекул карнозина с двумя атомами CoII, молекулами воды и кислородным мостиком оказался наиболее энергетически стабильным среди изученных нами комплексов карнозина с кобальтом. При образовании этого комплекса энергия комплекса значительно понижается по сравнению со свободными молекулами карнозина ~ 261234 ккал/моль (таблица 3). При сравнении этого комплекса с комплексами, образованными одной молекулой карнозина с таутомерными формами N¹H и N³H с атомом CoII и молекулой водорода энергия понижается на 242685,8 ккал/моль и 242584,2 ккал/моль соответственно.

Таблица 5. Заселенности атомных орбиталей атомов координационных связей комплекса 4карнозина+2CoII+2O₂+2H₂O (верхняя строчка – до, нижняя строчка – после оптимизации)

Атом		Орбиталь					Атом		Орбиталь				
		s	P _x	P _y	P _z				s	P _x	P _y	P _z	
Co 18	MM+	0,11	0,41	0,40	0,43		Co33		0,11	0,42	0,47	0,39	
	PM3	0,09	0,41	0,43	0,39				0,09	0,39	0,44	0,40	
	Δ	-0,02	0,00	0,03	-0,04				-0,02	-0,03	-0,03	0,01	
		Dz2	Dxz	Dyz	Dx2	Dxy			Dz2 Co	Dxz	Dyz	Dx2	Dxy
	MM+	1,78	1,60	1,24	1,77	1,48			1,08	1,97	1,84	1,26	1,75
	PM3	1,56	1,72	1,47	1,91	1,25			1,20	1,93	1,73	1,18	1,87
	Δ	0,22↓	0,12↑	0,23↑	0,14↑	0,23↓			0,12↑	0,04↓	0,11↓	0,08↓	0,12↑
N 2		s	P _x	P _y	P _z		N66		s	P _x	P _y	P _z	
	MM+	1,31	1,26	1,08	1,05				1,30	1,36	0,99	1,03	
	PM3	1,36	1,17	1,18	1,05				1,38	1,35	1,01	1,06	
N 5		Δ	0,05	-0,09	0,10	-	N83		0,08	0,01	0,02	0,03	
	MM+	1,28	1,21	1,01	1,17				1,29	1,12	1,24	1,03	
	PM3	1,28	1,24	1,09	1,02				1,29	1,07	1,25	1,04	
O 17 O-O		Δ	-	0,03	0,08	-0,15	O16		-	-0,05	0,01	0,01	
	MM+	1,84	1,46	1,36	1,73				1,84	1,35	1,42	1,71	
	PM3	1,84	1,63	1,66	1,20				1,84	1,48	1,77	1,16	
N 35 имид. связью		Δ	-	0,17	0,30	-0,53	N21		-	0,13	0,35	-0,56	
	MM+	1,30	1,25	1,14	1,22				1,29	1,39	1,10	1,11	
	PM3	1,45	1,17	1,14	1,36				1,41	1,36	1,08	1,27	
N 43 имид. атомом		Δ	0,15	-0,08	-	0,14	N31		0,12	-0,03	-0,02	0,16	
	MM+	1,30	1,18	1,01	1,15				1,29	0,96	1,22	1,12	
	PM3	1,28	1,09	1,00	1,09				1,26	0,99	1,07	1,14	
O 48 H20		Δ	-0,02	-0,09	-0,01	-0,06	O51		-0,03	0,03	-0,15	0,02	
	MM+	1,67	1,43	1,57	1,47				1,67	1,50	1,26	1,73	
	PM3	1,71	1,68	1,37	1,50				1,70	1,51	1,52	1,55	
	Δ	0,04	0,25	0,20	0,03				0,03	0,01	0,26	-0,18	

Таким образом, проведенное нами исследование показывает, что образование исследованных нами комплексов карнозина с кобальтом приводит к перераспределению электронной плотности. Атом кобальта является донором электронной плотности в комплексах и при образовании хелатных колец его влияние распространяется на все атомы образующихся координационных колец.

Полученные результаты могут быть полезными при моделировании других возможных комплексов карнозина с кобальтом и для синтеза новых лекарственных препаратов на основе комплексов карнозина с атомами кобальта.

Список литературы / References:

1. Болдырев А.А. *Карнозин*. М.: Изд-во МГУ, 1998, 320 с. [Boldyrev A.A. *Carnosine*. Moscow: Publishing house of the Moscow State University, 1998, 320 p. (In Russ.)]
2. Болдырев А.А. Проблемы и перспективы исследования биологической роли карнозина. *Биохимия*, 2000, т. 65, № 7, с. 884-890. [Boldyrev A.A. Problemy i perspektivy issledovaniya biologicheskoi roli karnozina. *Biokhimiya*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 884-890. (In Russ.)]
3. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*, 2013, vol. 93, no. 4, pp. 1803-1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012.
4. Cararo J.H., Streck E.L., Schuck P.F., Ferreira G.da C. Carnosine and Related Peptides: Therapeutic Potential in Age-Related Disorders. *Aging and Disease*, 2015, vol. 6, no. 5, pp. 369-379. DOI: 10.14336/AD.2015.0616.
5. Kawahara M., Tanaka K.-I., Kato-Negishi M. Zinc, Carnosine, and Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*, 2018, vol. 10, no. 2, p. 147. DOI: 10.3390/nu10020147.
6. Zhao J., Posa D.K., Kumar V., Hoetker D., Kumar A., Ganesan S., Riggs D.W., Bhatnagar A., Wempe M.F., Baba S.P. Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products. *Amino Acids*, 2019, vol. 51, no. 1, pp. 123-138.
7. Peters V., Lanthaler B., Amberger A., Fleming T., Forsberg E., Hecker M., Wagner A.H., Yue W.W., Hoffmann G.F., Nawroth P., Zschocke J., Schmitt C.P. Carnosine metabolism in diabetes is altered by reactive metabolites. *Amino Acids*, 2015, vol. 47 no. 11, pp. 2367-2376. DOI: 10.1007/s00726-015-2024-z.
8. Бэран Э.Х. Металлокомплексы карнозина. *Биохимия*, 2000, т. 65, № 7, с. 928-937. [Baran E.J. Metal complexes of carnosine. *Biochemistry (Moscow)*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 789-797. Translated from *Biokhimiya*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 928-937]

9. Demukhamedova S.D., Alieva I.N., Godjayevev N.M. Spatial and electronic structure of monomeric and dimeric complexes of carnosine with zinc. *J. Struct. Chem.*, 2010, vol. 51, no. 5, pp. 824-832. DOI: 10.1007/s10947-010-0127-7.
10. Demukhamedova S.D., Alieva I.N., Gajiyev Z.I. Quantum chemistry investigation of the carnosine polymer complex with zinc. *Fizika*, 2010, vol. XVI, no. 2, pp. 597-600.
11. Демухамедова С.Д., Алиева И.Н., Гаджиев З.И., Годжаев Н.М. Ab initio исследование структуры и колебательного спектра молекулы карнозина. *Journal of Qafqaz University*, 2009, № 27, с. 15-25. [Demukhamedova S.D., Alieva I.N. Hadjiev Z.I., Godjayevev N.M. Ab initio issledovanie strukturi i kolebatelnogo spectra molekuli karnozina. *Journal of Qafqaz University*, 2009, no. 27, pp. 15-25. (In Russ.)]
12. Kustin K., Pasternack R.F. The Reaction of L-Carnosine with Cobalt. *Journal of the American Chemical Society*, 1968, vol. 90, p. 11.
13. Brown C.E., Antholine W.E. Multiple forms of the cobalt(II)-carnosine complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1979, vol. 88, no. 2, pp. 529-536. DOI: 10.1016/0006-291X(79)92080-1.
14. Ken-ichi O., Takaji Y., Hiroshi K., Tomoharu A., Jinsai H. Unusual Coordination Mode of Carnosine (β -Alanyl-L-histidine) in a Cobalt(III) Complex. *Chemistry Letters*, 1988, pp. 335-338. DOI: 10.1246/cl.1988.335.
15. Tomoharu A., Hiroshi K., Masato U., Norio K., Takaji Y. Metal Complexes of Peptides. IV. Cobalt(III) Complexes with β -Alanyl-L-histidine (Carnosine) Functioning as a Quadridentate Ligand. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1989, vol. 62, no. 11, pp. 3464-3468. DOI: 10.1246/bcsj.62.3464.
16. Saha M.K., Mukhopadhyay U., Bernal I. Cleavage of the peptide bond of β -alanyl-L-histidine (carnosine) induced by a Co^{III} -amine complexes: reaction, structure and mechanism. *Dalton Trans.*, 2004, no. 9, pp. 1466-1473. DOI: 10.1039/B402571G.
17. Torreggiani A., Taddei P., Fini G. Characterization of dioxygenated cobalt(II)-carnosine complexes by Raman and IR spectroscopy. *Biopolymers*, 2002, vol. 67, no. 1, pp. 70-81. DOI: 10.1002/bip.10025.
18. Torreggiani A., Taddei P., Tintib A., Fini G. Vibrational study on the cobalt binding mode of Carnosine. *Journal of Molecular Structure*, 2002, vol. 641, no. 1, pp. 61-70.
19. Torreggiani A., Trincherio A., Tamba M., Fini G. Vibrational characterisation and biological activity of carnosine and its metal complexes. *Ital. J. Biochem.*, 2003, vol. 52, no. 2, pp. 87-97.
20. Tidjani-Rahmouni N., Djebbar S., Benali-Baitich O. Synthesis, spectroscopic and electrochemical characterization of mixed cobalt complexes with aminoacids and isonitrosoacetophenone. Biological activities. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. 424-437. DOI: 10.13171/mjc.2.2.2012.12.11.22.
21. Alabdali A.J., Al-Amery M.H. A. Synthesis, Thermal Study and Biological Activity of Cobalt (II) and Copper (II) Mixed Ligand Complexes Using (N-4-Methoxy Phenyl) Amino Phenyl Acetonitrile and Histidine Ligands. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 2019, vol. 11, no. 1, pp. 155-158.

QUANTUM-CHEMICAL STUDY OF COMPLEXES OF TWO TAUTOMERIC FORMS OF CARNOSINE WITH COBALT

Demukhamedova S.D.

Institute for Physical Problems, Baku State University
Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan, e-mail: svetlanabest@mail.ru

Abstract. The spatial and electronic structures of complexes consisting of a carnosine molecule with one cobalt ion Co(II) or Co(III) were investigated using the molecular mechanics MM^+ and the semi-empirical method of quantum chemistry PM3. The impact of the cobalt atom on the geometric and energy parameters of the complexes in both tautomeric forms of the imidazole ring of carnosine N^1H and N^3H was studied. In the studied complexes $\text{N}^1\text{H}+\text{Co}+\text{H}$ and $\text{N}^3\text{H}+\text{Co}+\text{H}$, the Co(II) atom is joined by a coordination bond with one of the nitrogen atoms of the imidazole ring. For the complex of carnosine with Co(III) ion a structure was chosen where the cobalt atom has a coordination number of four and forms a chelate ring of seven bonds. The energy preference of complexes with the tautomeric form of N^3H is shown. The carnosine complex in the tautomeric form of N^3H with the cobalt ion Co(III) is more stable, the nitrogen atom of the imidazole ring of which is an electron donor. A complex consisting of four carnosine molecules, coordinated by two cobalt ions connected by an oxygen bridge and water molecules, was also investigated. In the process of binding, each cobalt atom forms coordination cavities in the form of two six-membered chelate rings and an imidazole carnosine ring, which has a common coordination bond with the chelate ring. This complex turned out to be the most energy stable.

Key words: carnosine, complexes, cobalt, quantum chemical calculations, structure.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МЕХАНИЗМА ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ПОДАВЛЕНИЯ СЕРДЕЧНОЙ АРИТМИИ

Зорин Н.М., Шевченко М.И., Москвин А.С.

Уральский федеральный университет

ул. Мира, 19, г. Екатеринбург, 620002, РФ; e-mail: maria.shevchenko@urfu.ru

Поступила в редакцию: 08.09.2019

Аннотация. В рамках обобщенной «двухосцилляторной» модели Мальцева-Лакатты, включающей электронно-конформационную модель рианодинных рецепторов, рассмотрена стохастическая модель ионной динамики сердечной клетки водителя ритма. Показано, что формирование потенциала действия существенно зависит от характера взаимодействия внешнего мембранного и внутриклеточного («Ca²⁺-часы») осцилляторов. Конструктивное взаимодействие осцилляторов приводит к формированию устойчивого потенциала действия, тогда как деструктивное взаимодействие приводит к паразитным эффектам, в частности, аритмии. Исследовано влияние параметров модели, характерных для синоатриального узла сердца кролика, на качественный вид временной зависимости мембранного потенциала клетки. Найдены условия и описан механизм спонтанного перехода колебаний в аномально быстрый режим, тем самым фактически смоделировано поведение клетки водителя ритма при тахикардии. Показано что подавление быстрого калиевого тока нормализует колебательный режим ионной динамики клетки водителя ритма, что соответствует действию антиаритмических препаратов III класса.

Ключевые слова: клетка водителя ритма, аритмия, модель Мальцева-Лакатты, электронно-конформационная модель, компьютерное моделирование.

Термином «аритмии» объединяются различные по механизму возникновения, проявлениям и прогнозу расстройства зарождения и проведения электрических импульсов сердца, при котором происходят нарушения частоты, ритмичности и последовательности возбуждения и сокращения сердца. Их возникновение связано с нарушениями проводящей системы сердца, обеспечивающей согласованные и регулярные сокращения миокарда – синусовый ритм. Аритмии могут вызывать тяжелые нарушения деятельности сердца или функций других органов, а также сами являться осложнениями различных серьезных патологий [1].

К настоящему времени антиаритмические средства делятся на четыре основных класса: I класс (блокаторы быстрых натриевых каналов), II класс (бета-адреноблокаторы), III класс (блокаторы калиевых каналов), IV класс (блокаторы медленных кальциевых каналов). I класс дополнительно делится на 3 подкласса. В основе этой классификации лежит действие препаратов на электрофизиологические свойства сердца, то есть на способность его клеток вырабатывать и проводить электрические сигналы. Препараты каждого класса действуют на свои «точки приложения», поэтому их эффективность при разных аритмиях отличается.

Активное развитие знаний в области антиаритмических препаратов привело к повышенному интересу к антиаритмическим средствам III класса. Широко известные исследования CAST (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) [2, 3] показали, что наряду с высокой эффективностью в лечении угрожающих жизни аритмий, препараты этого класса демонстрируют возможность снижения смертности от желудочковых нарушений ритма и положительное влияние на выживаемость больных, перенесших инфаркт миокарда.

Одним из важных преимуществ антиаритмических препаратов данного класса является и меньшее воздействие побочных эффектов в сравнении с представителями других классов. Эти же препараты увеличивают длительность QT-интервала (длительность потенциала действия). Основным механизмом действия антиаритмиков данного класса является блокировка быстрого калиевого тока задержанного выпрямления (I_{Kr}).

Очевидно, что разработка молекулярно-клеточных моделей, описывающих как механизм возникновения аритмии, так и ее подавления с помощью антиаритмических препаратов III класса является актуальной задачей биофизики. В данной работе рассмотрена стохастическая модель ионной динамики сердечной клетки водителя ритма, основанная на обобщенной модели Мальцева-Лакатты (ML), включающей электронно-конформационную (EC) модель рианодин-чувствительных (RyR) каналов, являющихся основными молекулярными детерминантами Ca²⁺-гомеостаза. Найдены условия и описан механизм спонтанного возникновения «клеточной тахикардии» и переход в нормальный колебательный режим клетки водителя ритма за счет подавления быстрого калиевого тока, что соответствует действию антиаритмических препаратов III класса.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И МЕТОДЫ

Базовая модель Мальцева-Лакатты активности клетки водителя ритма.

За основу развиваемой нами модели клетки водителя ритма взята модель Мальцева-Лакатты (ML-модель) [6], предполагающая стандартное упрощенное строение клетки, включающее четыре основных компонента: диадное пространство, цитозоль, сеть саркоплазматического ретикулума (CP) и высвобождающий отдел терминальных цистерн CP (люмен) (рис. 1). Для описания внешнего мембранного осциллятора авторы

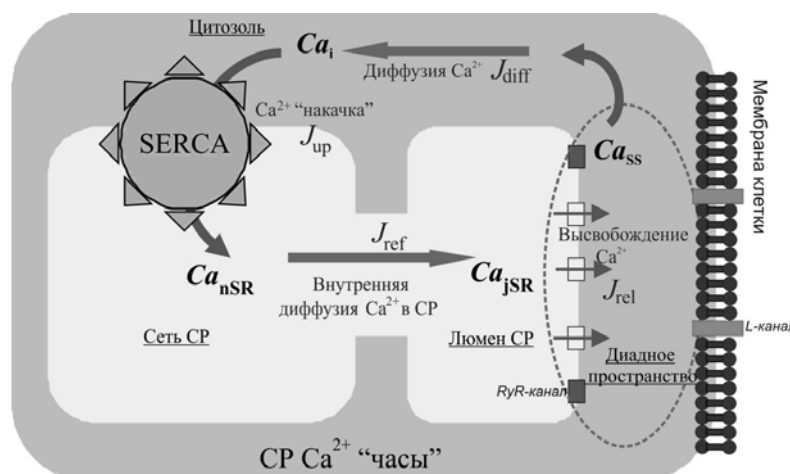


Рисунок 1. Схематическое изображение клетки водителя сердечного ритма кролика: Ca_i — концентрация Ca^{2+} в цитозоле, Ca_{nSR} — в сети CP, Ca_{jSR} — в люмене CP. J_{rel} — поток Ca^{2+} , высвобождающегося из CP, J_{diff} — поток диффузии кальция из диадного пространства в цитозоль, J_{up} — поток поглощения (закачки) кальция из цитозоля в сеть CP

применили теорию мембранных токов ионов Ca^{2+} , Na^{2+} , Mg^{2+} и K^{+} (модель Кураты) [9, 10], а для описания кинетики внутриклеточного Ca^{2+} — модель Шэннона [11, 12], что при объединении привело к системе 29 дифференциальных уравнений.

Концентрации Ca^{2+} в диадном пространстве и в люмене CP (Ca_{ss} и Ca_{jSR} соответственно) являются главными управляющими величинами ML-модели, подчиняющимися стандартным кинетическим уравнениям с учетом псевдо-стационарной диффузии между диадным пространством, саркоплазмой и отделами CP.

Потенциал действия (ПД) формируется совокупностью трансмембранных ионных токов и определяется уравнением:

$$\frac{dV}{dt} = - \frac{\sum I_{membrane}}{C_m},$$

где C_m — мембранная электроёмкость; $\sum I_{membrane}$ — сумма мембранных токов.

Одним из важнейших токов, определяющих мембранный потенциал, является так называемый «забавный ток» («funny current», I_f). Экспериментально продемонстрировано участие I_f тока в формировании процесса медленной диастолической деполяризации (ДД) и в регуляции скорости протекания этого процесса под влиянием химических агентов [13]. Показано, что снижение I_f снижает скорость ДД и увеличивает время достижения порогового значения мембранного потенциала для инициации потенциала действия, что обуславливает снижение частоты сердечных сокращений.

Проводимость рианодиновых каналов RyR-каналов, играющих важнейшую роль в определении динамики Ca^{2+} , рассматривалась в упрощенном виде как некая функция концентрации Ca^{2+} , высвобождающегося в диадном пространстве.

В работе [6] показано, что изолированный CP действительно может вести себя как самоподдерживающийся осциллятор (« Ca^{2+} -часы»), который можно описать простейшим механизмом «накопление-сброс». В ML-модели малое «первичное» спонтанное высвобождение Ca^{2+} из люмена в диадное пространство является своеобразным триггером, инициирующим колебательную динамику всей системы. Когда концентрация Ca_{ss} достигает некоторого критического значения, она усиливает процесс «вторичного» высвобождения Ca^{2+} посредством механизма КВВК. Это достаточно сильное высвобождение Ca^{2+} в свою очередь резко уменьшает уровень Ca_{jSR} , а высвобожденный Ca^{2+} поглощается сетью CP (Ca_{nSR}). Длительность задержки между высвобождениями определяется скоростью закачки Ca^{2+} из цитозоля в сеть CP, диффузии из сети CP в люмен, высвобождения из люмена в диадное пространство и диффузии из диадного пространства в цитозоль. В процессе заполнения люмена и достаточно медленного увеличения Ca_{jSR} происходит постепенное открытие RyR-каналов, затем имеет место следующее высвобождение и т.д.

Результаты численных экспериментов по исследованию самосогласованного поведения кальциевых и мембранных «часов», проведенных в рамках ML-модели для параметров, характерных для синоатриального узла сердца кролика (рис. 2), хорошо согласуются с экспериментальными данными [4, 5] по частоте осцилляций Ca^{2+} -«часов», форме и амплитуде ПД.

Динамика всех переменных ML-модели описывается детерминированными уравнениями, поэтому в рамках этой модели при постоянных параметрах может быть описана только регулярная аритмия типа синусовой тахикардии или синусовой брадикардии. Очевидно, что для описания эффектов нерегулярной аритмии требуется

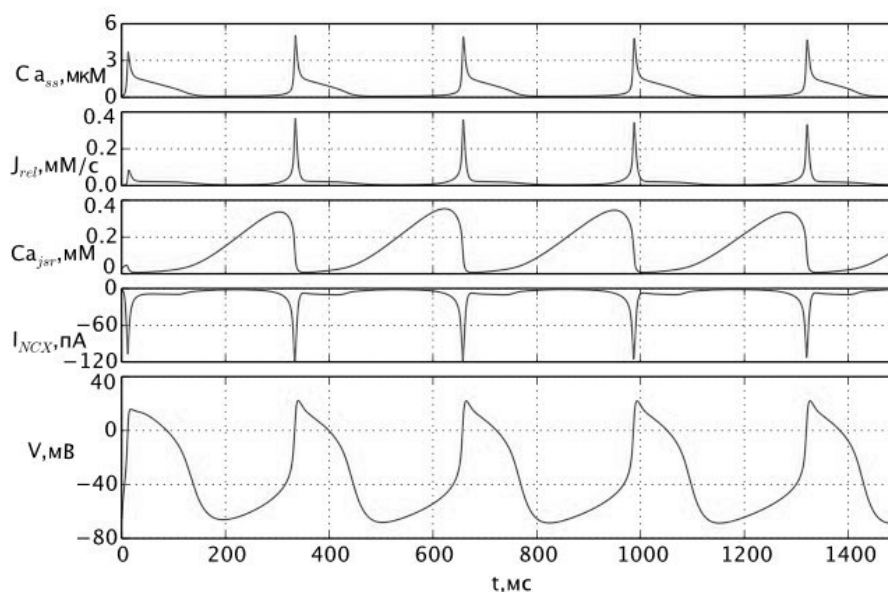


Рисунок 2. Графики временной зависимости основных электрических характеристик, полученные в ходе численного эксперимента на оригинальной модели Мальцева-Лакатты: Ca_{ss} – концентрация кальция в диадном пространстве, J_{rel} – ток высвобождения кальция из люмена СР, I_{NCX} – ток натрий-кальциевого обменника, V_m – мембранный потенциал

более реалистичное моделирование Ca^{2+} -осцилляторов в клетках САУ, которое должно включать в себя биофизически обоснованную стохастическую модель динамики изолированных RyR-каналов и соответствующих кластеров, определяющих стохастический характер локальных Ca^{2+} -высвобождений.

Электронно-конформационная модель динамики RyR-каналов.

Современные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что одной из основных причин возникновения хронических заболеваний сердца (аритмия, сердечная недостаточность и пр.) является нарушение внутриклеточной динамики ионов кальция [14]. По современным представлениям именно динамика ионов Ca^{2+} является центральным звеном электро-механического сопряжения в рабочих кардиомиоцитах и формирования сердечного ритма в клетках синоатриального узла (SANC).

Важнейшими элементами внутриклеточной регуляции динамики ионов кальция являются лиганд-активируемые рианодин-чувствительные рецепторы (каналы) RyR. Рецепторы сердечного типа (RyR2) являются общими основными каналами высвобождения Ca^{2+} в SANC и желудочковых миоцитах. Нарушения нормального функционирования RyR2 каналов является основной причиной многих сердечных патологий, таких как унаследованная аритмия, сердечная недостаточность и кардиомиопатия. RyR2 рассматривается как важнейший новый элемент медикаментозной терапии.

В работах [14-17] была предложена и развита электронно-конформационная (ЭК) модель одиночного RyR-канала и кластера RyR-каналов, способная описать важнейшие особенности поведения изолированных и взаимодействующих RyR-каналов как в рабочих кардиомиоцитах, так и в клетках водителя сердечного ритма.

Этот гигантский ($\sim 30 \times 30 \times 15$ нм) макромолекулярный белковый комплекс, содержащий 4 субъединицы 565 kDa каждый, имеет огромное число внутренних электронных и конформационных степеней свободы. В ЭК-модели огромное число степеней свободы RyR-канала сводится к двум – быстрой и медленной, условно названных соответственно электронной и конформационной. В простейшем варианте модели предполагается существование только двух электронных состояний канала: условно «закрытого» и «открытого», то есть неактивированного и активированного лигандом, соответственно, а единственная конформационная координата Q определяет «сечение» RyR-канала и считается классической переменной.

Принципиально новым элементом ЭК-модели является «энергетический» подход, то есть введение энергии как важнейшей характеристики состояния RyR-канала, меняющейся в процессе функционирования канала.

Состояния канала описываются двухъямным конформационным потенциалом (КП) (рис. 3), минимумы которого соответствуют открытому и закрытому состояниям RyR-канала:

$$E_{\pm}(Q) = \frac{K}{2}Q^2 - pQ \pm \frac{1}{2}\sqrt{(\Delta - aQ)^2 + h^2},$$

где Q – конформационная координата; K – коэффициент упругости канала ($\frac{K}{2}Q^2$ – «упругая» энергия RyR канала); p – параметр эффективного давления, a – константа электронно-конформационного взаимодействия; Δ , h – эффективные электронные параметры [12].

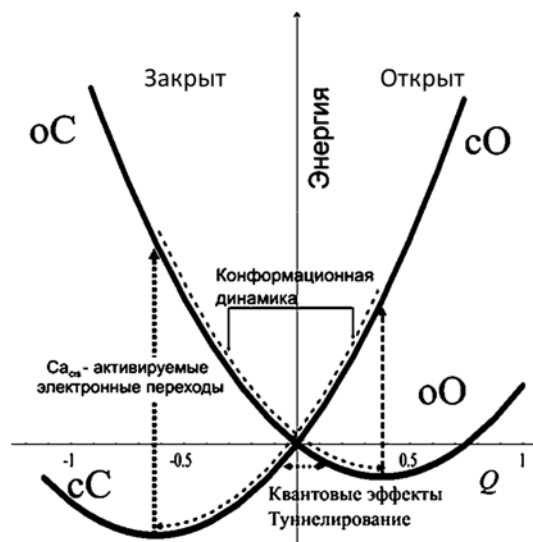


Рисунок 3. Схематическое изображение ветвей двухъямного конформационного потенциала электронно-конформационной модели

Динамика RyR-канала включает быстрые («франк-кондоновские») электронные переходы между ветвями (±) КП, классическую «ланжевеновскую» конформационную динамику, а также классические термоактивируемые и квантовые туннельные резонансные «не-франк-кондоновские» переходы.

Вероятность электронной активации RyR-каналов P_{el} зависит в ЭК-модели от концентрации Ca^{2+} в диадном пространстве. В данной работе эта вероятность полагалась пороговой:

$$P_{el} = \lambda_{el}^{max} \frac{Ca_{ss}}{Ca_{ss} + Ca_{crit}},$$

при $Ca_{ss} > Ca_{ss}^{cr}$ и $P_{el}=0$ при $Ca_{ss} < Ca_{ss}^{cr}$, где $\lambda_{el}^{max} = 0,01$ (в безразмерных единицах) – амплитуда вероятности электронных переходов, $Ca_{crit} = 1.2$ мкМ, Ca_{ss}^{cr} – пороговое значение концентрации Ca_{ss} ионов Ca^{2+} в диадном пространстве, при котором начинается активация каналов.

Ранее было показано, что ЭК-модель способна описать следующие известные на сегодняшний день эффекты (см., например, статьи [14, 15]): стохастический характер динамики каналов при стационарных условиях, изменение вероятности процессов открытия закрытия каналов при различном уровне концентрации Ca^{2+} со стороны диадного пространства и со стороны люмена СР, процесс адаптации канала и др.

На основе ЭК-модели RyR-канала была разработана модель высвобождающей единицы сердечной клетки, включающей кластер структурно и функционально сопряженных RyR-каналов (от десятков до сотен каналов, образующих, как правило, фрагмент квадратной решетки), люмен СР и соответствующее диадное пространство, и включены в модель динамики кальция в сердечной клетке [18, 19].

В процессе проведения компьютерных экспериментов на базе ЭК-модели было показано, что изолированная от мембранных «часов» высвобождающая единица в клетке водителя сердечного ритма может вести себя как самоподдерживающийся осциллятор с различными значениями частоты и амплитуды концентрации Ca^{2+} во всех отделах высвобождающей единицы [17], даже в условиях стохастической динамики выделения кальция RyR каналами. Включение простой биофизически обоснованной ЭК-модели RyR-каналов в модель высвобождающей единицы позволяет объяснить формирование и свойства спонтанного колебательного режима как в клетке водителей сердечного ритма при нормальных физиологических условиях, так и в рабочем кардиомиоците при перегрузке люмена СР кальцием [22]. Перегрузка определяется соотношением $Ca_{jSR} > K_{Ca}$, где K_{Ca} – параметр ЕС-модели.

Нами был дан детальный анализ различных динамических режимов работы высвобождающей единицы при изменении скорости заполнения люмена и константы конформационного взаимодействия между соседними RyR-каналами, анализ влияния параметров системы на частоту и амплитуду осцилляций [17]. В целом ЭК-модель предлагает новый взгляд на основные механизмы, управляющие потоками внутриклеточного кальция, и может служить отправной точкой для дальнейших исследований физических принципов формирования регулярной динамики сердечных клеток и ее нарушений *in vitro* и *in vivo*.

Обобщенная ML+ЕС модель динамики ионов Ca^{2+} в клетке водителя сердечного ритма.

В работе [17] предложена обобщенная ML+ЕС модель клетки водителя сердечного ритма, объединяющая ML-модель электрической активности клеток с электронно-конформационной моделью Ca^{2+} - высвобождающей системы [6].

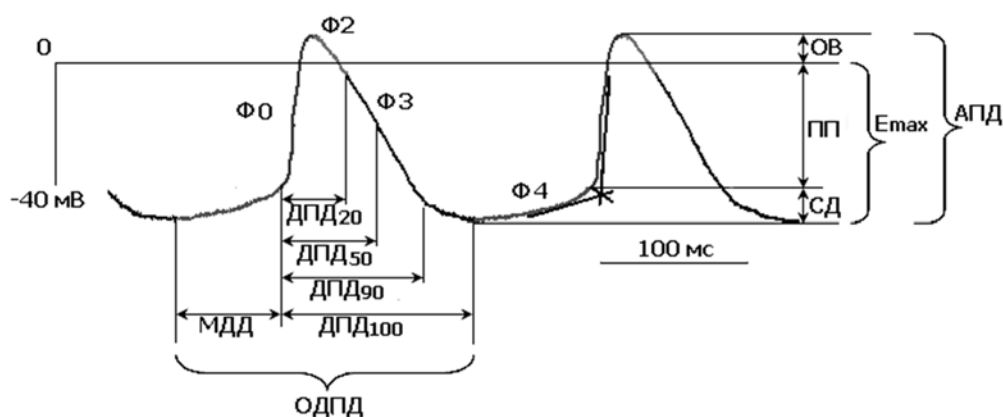


Рисунок 4. Основные амплитудные и временные параметры потенциала действия клеток водителя сердечного ритма: $\Phi 0$ – фаза быстрой деполяризации; $\Phi 2$ – фаза «плато»; $\Phi 3$ – фаза реполяризации; $\Phi 4$ – фаза медленной диастолической деполяризации; $E_{\max}$ – максимальный диастолический потенциал; ПП – потенциал порога; СД – амплитуда спонтанной деполяризации; ОВ – овершут; АПД – амплитуда ПД; ДПД20, ДПД50, ДПД90, ДПД100 – длительность потенциала действия на уровне 20, 50, 90 и 100% реполяризации; МДД – длительность фазы медленной диастолической деполяризации; ОДПД – общая длительность ПД

Полная система кластеров RyR-каналов сердечной клетки сводилась к одному эффективному кластеру, моделируемому квадратной решеткой 10×10 каналов. Число открытых каналов в кластере $N_{\text{open}} \in [0, 100]$, связывалось с величиной параметра O модели Мальцева-Лакатты, характеризующего способность рианодин-чувствительных каналов пропускать кальциевый ток. В обобщенной модели была предположена линейная связь:

$$O = k_{\text{RyR}} \cdot N_{\text{open}},$$

где коэффициент k_{RyR} принимался равным 10^{-7} , что обеспечивало средние значения величины O порядка 10^{-6} , типичные для модели Мальцева-Лакатты.

Для проведения компьютерного эксперимента был разработан программный комплекс, позволяющий моделировать динамику кальциевых потоков в клетке с учетом взаимодействия кальциевого и мембранного осцилляторов.

Таблица 1. Основные амплитудные и временные параметры потенциала действия, рассчитанные в ML-модели при различных значениях g_{Kr}

g_{Kr} , nS/pF	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12
АПД, мВ	53.29	67.73	74.92	79.00	81.46
ДПД ₁₀₀ , мс	186.71	178.71	157.50	137.43	122.17
ДПД ₂₀ , мс	44.71	54.00	54.25	48.86	45.33
ДПД ₅₀ , мс	85.86	93.86	87.13	77.00	69.50
ДПД ₉₀ , мс	137.43	134.00	118.88	103.43	91.83
$E_{\max}$, мВ	45.85	55.66	62.13	65.91	68.53
СД, мВ	28.16	38.44	27.70	18.09	19.98
МДД, мс	127.57	136.43	112.25	101.00	108.33
ОВ, мВ	7.44	12.08	12.79	13.09	12.93
ПП, мВ	17.69	17.21	34.44	47.82	48.54
ОДПД, мс	330.52	327.00	315.25	361.29	373.17

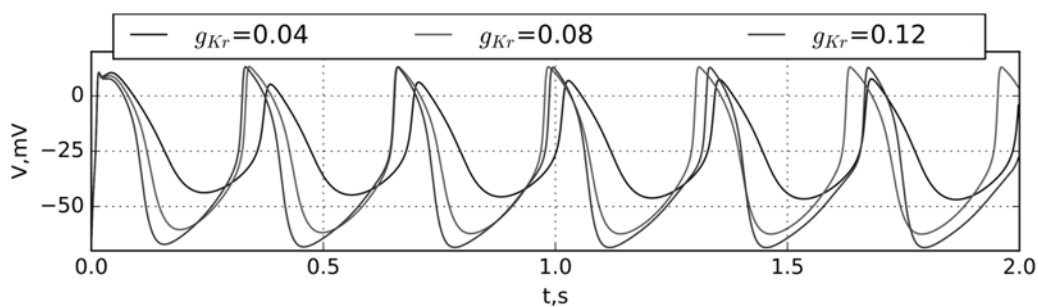


Рисунок 5. Графики временной зависимости мембранного потенциала в оригинальной ML-модели при различных значениях амплитуды быстрого калиевого тока g_{Kr}

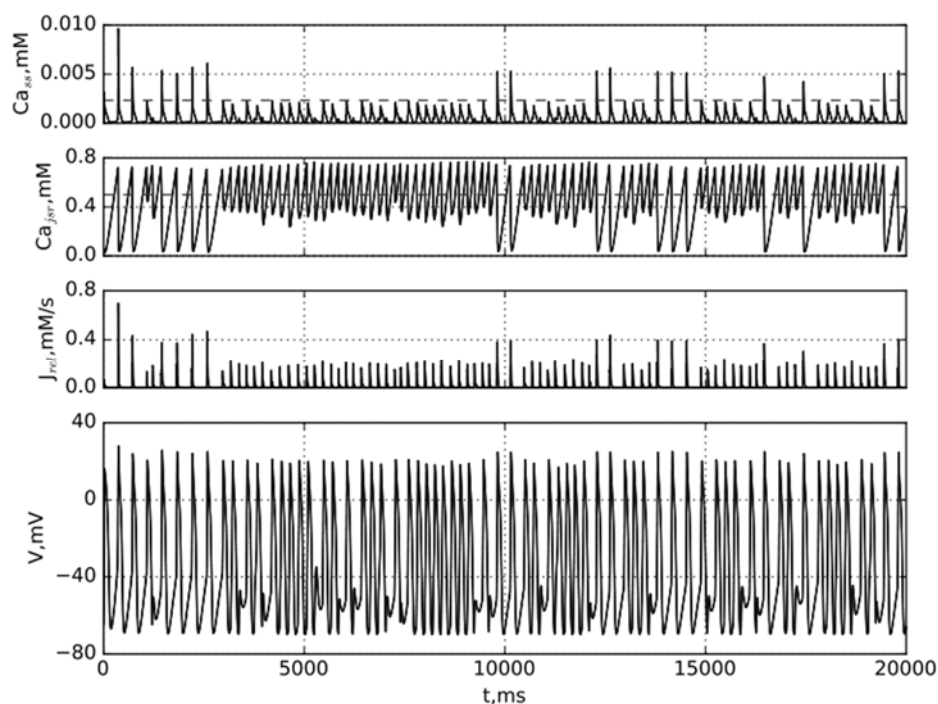


Рисунок 6. Графики временной зависимости основных электрических характеристик, полученные в ходе численного эксперимента на обобщенной ML+EC модели: Ca_{88} – концентрация ионов Ca^{2+} в диадном пространстве, Ca_{jkr} – в люмене CP, J_{rel} – ток высвобождения из люмена CP в диадное пространство, V – мембранный потенциал

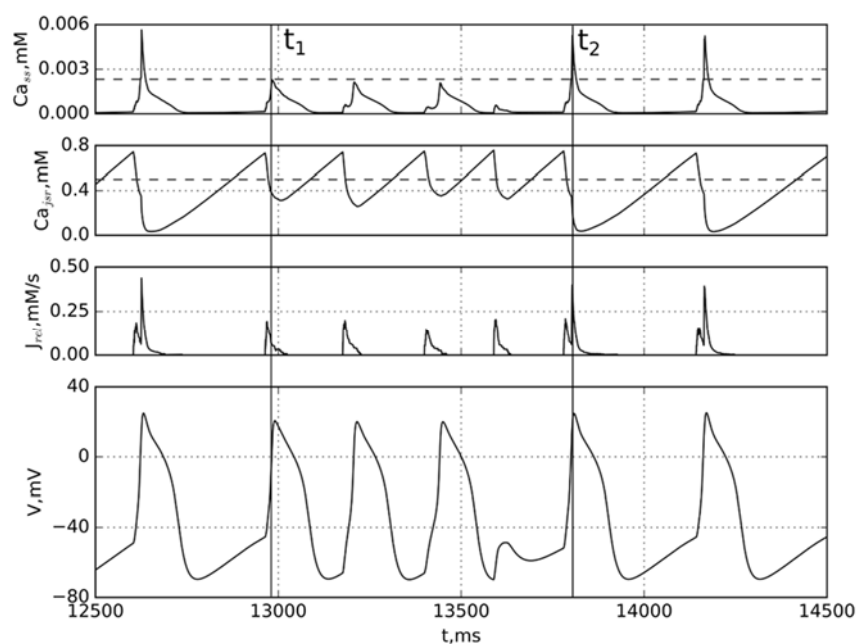


Рисунок 7. Фрагмент данных с рисунка 6 в интервале от 12500 до 14500 мс

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе настоящей работы была проведена серия численных экспериментов как на оригинальной ML-модели, так и на объединённой ML+ЕС модели с целью выяснения роли величины быстрого калиевого тока, прямо пропорциональной параметру модели g_{Kr} , а также стохастической динамики RyR каналов. Параметры ЕС-модели выбирались в соответствии с данными работы [22].

Прежде всего, в рамках ML-модели были рассчитаны основные временные и амплитудные параметры ПД, представленные на рисунке 4, при различных значениях g_{Kr} (табл. 1). Графики временной зависимости мембранного потенциала при различных значениях g_{Kr} представлены на рисунке 5 [18]. Как видно из графиков и таблицы, с ростом g_{Kr} повышается амплитуда колебаний $V(t)$, снижается длительность потенциала действия (ДПД), но ОДПД минимально при значении g_{Kr} , близком к 0,08 nS/pF, что соответствует значению этого параметра, принятому по умолчанию в работе [6].

В работе [17] было показано, что варьирование параметров обобщённой модели позволяет переключать ведущую роль с внешнего мембранного осциллятора на внутренний («Ca²⁺-часы») и наоборот. Прежде всего, это касается величины критической концентрации кальция в диадном пространстве, варьируя Ca_{SS}^{cr} можно качественно изменить форму временной зависимости мембранного потенциала и сделать внутренний кальциевый осциллятор ведущим или напротив, ведомым. Наряду с достаточно широкой областью параметров ML+ЕС модели, обеспечивающих конструктивное взаимодействие осцилляторов и устойчивый режим колебаний, существует «паразитная» область параметров, приводящих к деструктивному взаимодействию осцилляторов с нестабильным поведением объединённого осциллятора, то есть к аритмии. Временная зависимость основных электрических характеристик в условиях такой аритмии представлена на рисунке 6 при $g_{Kr} = 0,08$ nS/pF, $K_{Ca} = 0,5$ mM и $Ca_{SS}^{cr} = 0,0023$. Фрагмент этой зависимости в большем масштабе изображён на рисунке 7. В момент времени t_1 из люмена СР высвобождается количество ионов кальция, не достаточное для вторичного высвобождения, малое количество открытых каналов закрывается быстрее, чем в случае с вторичным высвобождением и таким образом уменьшается продолжительность высвобождения. В связи с этим сети и люмену СР требуется меньшее время для заполнения, и частота высвобождений повышается, повышение концентрации ионов кальция в диадном пространстве вызывает быструю деполяризацию мембраны и так частота колебаний мембранного потенциала повышается до частоты внутреннего кальциевого осциллятора. Затем в момент времени t_2 из люмена СР высвобождается количество ионов, достаточное для вторичного высвобождения. Это увеличивает продолжительность высвобождения, а также время заполнения СР, что приводит к снижению частоты колебаний внутреннего осциллятора и к нормализации временной зависимости мембранного потенциала.

Затем аналогичный численный эксперимент был проведен при $g_{Kr} = 0,045$ nS/pF, результат этого численного эксперимента представлен на рисунке 8. Как видно из этого рисунка, при понижении снижается вероятность перехода системы в режим быстрых колебаний внутреннего осциллятора.

Как видно из рисунка 5 и таблицы 1, изменения g_{Kr} в широком диапазоне не оказывают существенного влияния на качественный вид временной зависимости мембранного потенциала клетки в ML-модели. В

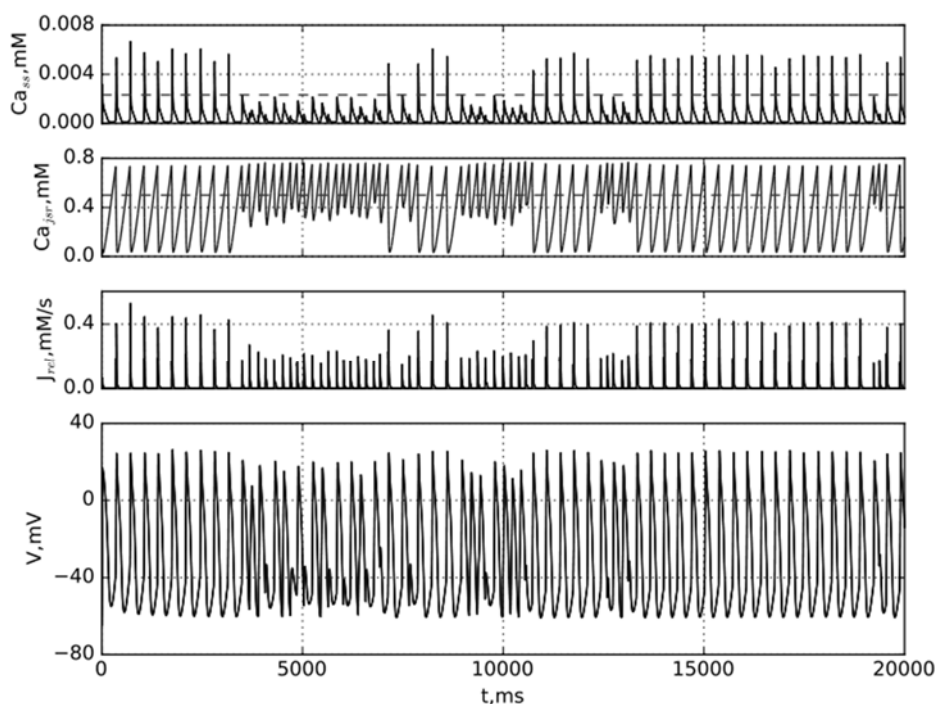


Рисунок 8. Графики временной зависимости основных электрических характеристик, полученные в ходе численного эксперимента на обобщенной ML+ЕС-модели при $g_{Kr} = 0,045$ nS/pF

объединенной ML+EC-модели спонтанный переход в аномально быстрый колебательный режим обусловлен параметрами одиночного RyR-канала и влияние на частоту колебаний $V(t)$ происходит именно за счёт подавления этого случайно возникающего режима, который не мог быть описан в рамках оригинальной МЛ модели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты анализа стохастической модели ионной динамики сердечной клетки водителя ритма в рамках обобщения известной модели Мальцева-Лакатты, включающего электронно-конформационную модель риаинодиновых рецепторов, являющихся основными молекулярными детерминантами Ca^{2+} гомеостаза. На оригинальной ML-модели рассмотрены основные амплитудные и временные характеристики потенциала действия при различных значениях параметра g_{Kr} , определяющего амплитуду быстрого калиевого тока в сердечной клетке. Показано, что при снижении g_{Kr} эти характеристики ведут себя так же, как и при блокировании калиевых каналов блокатором E-4031 [18]. В рамках объединённой ML+EC-модели был смоделирован случайный переход сердечной клетки водителя ритма из нормального режима работы в аномально быстрый, что соответствует тахикардии. Аналогичный переход не мог быть описан большинством существовавших ранее моделей, в которых не учитывается стохастический характер кальциевой динамики. Компьютерное моделирование показало, что снижение амплитуды быстрого калиевого тока под действием антиаритмических препаратов III класса приводит к снижению вероятности перехода системы в аномально быстрый автоколебательный режим.

Таким образом, в рамках объединённой ML+EC-модели была смоделирована спонтанно возникающая тахикардия и частичное её излечение антиаритмическими препаратами III класса.

Работа выполнена при поддержке Программы 211 Правительства Российской Федерации, соглашение № 02.A03.21.0006, и проекта №5719 Министерства Образования и Науки Российской Федерации.

Список литературы / References:

1. Мандела В.Дж. *Аритмии сердца. Механизмы. Диагностика. Лечение.* Медицина, М., 1996. [Heart arrhythmias. Translated from English under the editorship of V.J. Mandela. M.: Medicine, 1996 (In Russ.)]
2. The Cardiac Arrhythmias Suppression Trial Investigators (CAST). *N. Engl. J. Med.*, vol. 321, 406 (1989).
3. The Cardiac Arrhythmias Suppression Trial Investigators (CAST). *N. Engl. J. Med.* vol. 327, 233 (1992).
4. Vinogradova T.M., Zhou Y.Y., Maltsev V.A. et al. Rhythmic Ryanodine Receptor Ca^{2+} Releases During Diastolic Depolarization of Sinoatrial Pacemaker Cells Do Not Require Membrane Depolarization. *Circ. Res.*, 2004, vol. 94, no. 6, p. 802.
5. Bogdanov K.Y., Maltsev V.A., Vinogradova T.M. et al. Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca^{2+} releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state. *Res.*, 2006, vol. 99, p. 979.
6. Maltsev V.A., Lakatta E.G. Synergism of coupled subsarcolemmal Ca^{2+} clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2009, vol. 296, p. 594.
7. Bozler E. The Initiation of Impulses in Cardiac Muscle. *Amer. J. Physiol.*, 1943, vol. 138, p. 273.
8. Sobie E.A., Dilly K.W., Jafri M.S. Termination of cardiac of Ca^{2+} sparks: an investigative mathematical model of calcium-induced calcium release. *Biophys. J.*, 2002, vol. 83, p. 59.
9. Gyorke I., Gyorke S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca^{2+} involves luminal Ca^{2+} sensing sites. *Biophys. J.*, 1998, vol. 75, no. 6, p. 2801.
10. Wilders R., Jongsma H.J., van Ginneken A.C.G. Pacemaker activity of the rabbit sinoatrial node: a comparison of mathematical models. *Biophys. J.*, 1991, vol. 60, no. 5, p. 1202.
11. Shannon T.R., Pogwizd S.M., Bers D.M. Elevated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ. Res.*, 2003, vol. 93, no. 7, p. 592.
12. Shannon T.R., Wang F., Puglisi J. A Mathematical Treatment of Integrated Ca Dynamics within the Ventricular Myocyte. *Biophys. J.*, vol. 87, no. 5, p. 3351.
13. Kurata Y., Hisatome I., Imanishi S., Shibamoto T. Dynamical description of sinoatrial node pacemaking: improved mathematical model for primary pacemaker cell. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002, vol. 283, no. 5, p. H2074.
14. Bers D. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. *Springer*, New York, 2001.
15. Kurata Y., Hisatome I., Imanishi S., Shibamoto T. Roles of L-type Ca^{2+} and delayed-rectifier K^{+} currents in sinoatrial node pacemaking: insights from stability and bifurcation analyses of a mathematical model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, vol. 285, no. 6, p. H2804.
16. Baruscotti M., Bucci A., DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol. Ther.*, 2005, vol. 107, p. 59.
17. Moskvina A.S., Philipiev M.P., Solovyova O.E., Markhasin V.S. Electron-conformational model of nonlinear dynamics of the ryanodine channel lattice in cardiomyocytes. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2005, vol. 400, p. 32.

18. Moskvina A.S., Philipiev M.P., Solovyova O.E., Markhasin V.S. Electron-conformational model of ryanodine receptor lattice dynamics. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2006, vol. 90, p. 88.
19. Moskvina A.S., Iaparov B.I., Ryvkin A.M., Solovyova O.E., Markhasin V.S. Electron-conformational transformations govern the temperature dependence of the cardiac ryanodine receptor gating. *JETP Letters*, 2015, vol. 102, no. 1, p. 67.
20. Рывкин А.М., Москвин А.С., Соловьева О.Э., Мархасин В.С. Моделирование автоволновой кальциевой динамики в кардиомиоцитах в рамках электронно-конформационной теории. *Докл. РАН*, 2012, т. 444, № 5, с. 572. [Ryvkin A.M., Moskvina A.S., Solovyova O.E., Markhasin V.S. Simulation of autowave calcium dynamics in cardiomyocytes in the framework of electron-conformational theory. *Proceedings of the Academy of Sciences*, 2012, vol. 444, no. 5, p. 572. (In Russ.)]
21. Moskvina A.S., Ryvkin A.M., Solovyova O.E., Markhasin V.S. Electron-conformational transformations in nanoscopic RyR channels govern both the heart's contraction and beating. *JETP Letters*, 2011, vol. 93, no. 7, pp. 403-408.
22. Ryvkin A.M., Zorin N.M., Moskvina A.S., Solovyova O.E., Markhasin V.S. The Interaction Of The Membrane And Calcium Oscillators In Cardiac Pacemaker Cells: Mathematical Modeling. *Biofizika*, 2015, vol. 60, no. 6, p. 946.
23. Гонотков М.А. Дис. ... канд. биол. наук (Ин-т физиологии Коми науч. центра УрО РАН, Сыктывкар, 2015. [Gonotkov M.A. Diss. ... Cand. Biol. Sciences (Institute of physiology of Komi). center Uro RAS, Syktyvkar, 2015. (In Russ.)]
24. Malev V.V., Kaulin Y.A., Bezrukov S.M., Gurnev P.A., Takemoto J.Y., Shchagina L.V. Kinetics of opening and closure of syringomycin E channels formed in lipid bilayers. *Membr. Cell Biol.*, 2001, vol. 14, pp. 813-829.

COMPUTER SIMULATION OF THE INTRACELLULAR MECHANISM OF THE CARDIAC ARRHYTHMIA CREATION AND SUPPRESSION

Zorin N.M., Shevchenko M.I., Moskvina A.S.

Ural Federal University, Institute of Natural Sciences and Mathematics
620002, 19 Mira Str., Ekaterinburg, Russia, e-mail: maria.shevchenko@urfu.ru

Abstract. We consider a stochastic model of the ion dynamics of the pacemaker's heart cell based in the generalized Maltsev-Lakatta model of two oscillators including the electron-conformational model of ryanodine receptors. It is shown that the formation of the action potential significantly depends on the nature of interactions between the external membrane and intracellular ("Ca²⁺ clock") oscillators. The constructive interaction between oscillators leads to the formation of a stable action potential, while a destructive interaction leads to parasitic effects, in particular, arrhythmias. We examined the influence of the model parameters characteristic of the rabbit sinoatrial heart node on the qualitative aspect of the time dependence of the cell membrane potential. The conditions under which spontaneous transition of oscillations to the abnormally fast mode occurs have been found and this mechanism has been described, thereby the behavior of the pacemaker cell during tachycardia has actually been modeled. Computer simulation shows that the suppression of fast potassium current normalizes the oscillatory mode of the ion dynamics of the pacemaker cell, that corresponds to the action of class III antiarrhythmic drugs.

Key words: pacemaker cell, arrhythmia, Maltsev-Lakatta model, electron-conformational model, computer simulation.

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФУЛЛЕРЕНА C_{60} С ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ МЕТОДАМИ КВАНТОВОЙ МЕХАНИКИ

Васильев М.М.¹, Костюкова Л.О.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

² Черноморское высшее военно-морское училище им. П.С. Нахимова

ул. Дыбенко, 1а, г. Севастополь, 299028, РФ; e-mail: lyudmilakostyukova@mail.ru

Поступила в редакцию: 05.10.2019

Аннотация. Проведен теоретический анализ взаимодействия биологически активного соединения фуллерена C_{60} с органическими растворителями – 1-хлорнафталином, хлороформом и метанолом. В работе выполнены квантовомеханические расчеты исследуемых молекул в свободном состоянии и в составе 1:1 комплексов. Установлена корреляция расчетных энергий межмолекулярных взаимодействий фуллерена с молекулами растворителя и растворимостью, наблюдаемой в эксперименте.

Ключевые слова: фуллерен C_{60} , 1-хлорнафталин, хлороформ, метанол, комплексообразование, энергии межмолекулярных взаимодействий, растворимость.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее динамично развивающихся научных направлений является химическая физика фуллеренов – аллотропных форм углерода. В молекулах фуллеренов атомы углерода расположены в вершинах правильных шести- и пятиугольников, покрывающих регулярным образом поверхности сферы или сфероида. Наиболее распространенным и детально изученным фуллереном является C_{60} , структура которого соответствует правильному усеченному икосаэдру. Поверхность C_{60} образована двадцатью правильными шестиугольниками и двенадцатью правильными пятиугольниками. При этом каждый пятиугольник граничит только с шестиугольниками, а каждый шестиугольник – поочередно с тремя пятиугольниками и тремя шестиугольниками. Наряду с C_{60} , к фуллеренам относятся также молекулы C_{70} , C_{76} , C_{78} , C_{84} и др., характеризующиеся более низкой симметрией и большим числом шестиугольников на поверхности. Таким образом, фуллерены составляют уникальный класс молекул с замкнутой двумерной структурой. Изучение поведения фуллеренов в растворах имеет как фундаментальное, так и прикладное значение [1].

Фундаментальный интерес к этому вопросу вызван прежде всего тем, что фуллерены являются единственной из трех известных в настоящее время аллотропных модификаций углерода (наряду с графитом и алмазом), которая обладает заметной растворимостью в широком классе органических растворителей. Такая особенность обусловлена необычной структурой фуллеренов, которая, в отличие от других модификаций углерода, не имеет острых выступов и «висящих» связей, имеющих повышенную химическую активность. Это приводит к весьма слабому взаимодействию молекул фуллерена между собой в кристалле и, таким образом, способствует растворению фуллеренов в органических растворителях, структура молекул которых содержит ароматические шестичленные кольца углерода, по форме близкие элементам поверхностной структуры фуллеренов. Экзотическая структура фуллеренов обуславливает также их необычное поведение в растворах. Поскольку удельные поверхностные энергии взаимодействия молекул фуллеренов друг с другом и с молекулами растворителя незначительно различаются между собой, фуллерены в растворах проявляют тенденцию к образованию агрегатов, или кластеров, состоящих из нескольких молекул. В термодинамически равновесном состоянии при достаточно высокой концентрации фуллеренов в растворе подавляющая их часть находится в виде кластеров. Это единственный случай, когда практически все вещество находится в кластерном состоянии. Более типичной является ситуация, когда доля вещества, находящегося в виде кластеров, относительно мала. Таким образом, изучение поведения фуллеренов в растворах не только дает новую информацию об их свойствах, но и расширяет представления о макроскопических характеристиках вещества, в основном, состоящего из кластеров. Необычные физико-химические особенности фуллеренов в растворах, обусловленные, с одной стороны, их экзотической структурой, а с другой – возможностью образования кластеров, делают их интересным объектом химической физики [1].

Практический интерес к исследованию поведения фуллеренов в растворах обусловлен тем, что современные методы получения и очистки фуллеренов основаны на использовании растворителей. В результате интенсивного теплового воздействия на поверхности кристаллического графита образуется сажа, в состав которой входит до 20 % фуллеренов. Отделение фуллеренов от сажи основано на том, что фуллерены, в отличие от других компонентов сажи, хорошо растворяются в некоторых растворителях (толуоле, бензоле, ксилоле, сероуглероде и др.). Важно также, что растворимости различных видов фуллеренов (например, C_{60} и C_{70}) являются величинами одного порядка, однако могут в несколько раз отличаться между собой. На этом различии основан один из эффективных методов разделения фуллеренов [1].

Фуллерены практически не растворимы в полярных жидкостях типа спиртов, ацетона, тетрагидрофурана и т.п. Это свидетельствует о несущественной роли сольватационного механизма растворения (сольват представляет

собой молекулу растворенного вещества с оболочкой из молекул растворителя, ориентированных соответствующим образом). Они слабо растворимы в алканах нормального строения (пентан, гексан, декан и др.); с увеличением числа атомов углерода растворимость в алканах возрастает. Лучше всего фуллерены растворяются в таких веществах, для которых величина удельной энтальпии испарения (отнесенной к объему молекулы растворителя) близка к соответствующему значению для молекулы фуллерена (примерно 100 кал/см³). Эту закономерность можно рассматривать как одно из количественных проявлений известного эмпирического правила - «подобное растворяется в подобном». Наиболее высокой растворимостью фуллеренов обладают ароматические углеводороды и их производные, среди которых лидируют производные нафталина. Поскольку основой ароматических соединений являются одно или несколько бензольных колец, структура которых близка к правильным шестиугольникам, образующим поверхность молекулы фуллерена, данный результат не является случайным. Можно предположить, что высокая растворимость фуллеренов в соединениях, имеющих в своей структуре шестичленные углеродные кольца, обусловлена магнитным взаимодействием кольцевых токов, протекающего в молекулах растворителя и молекуле фуллерена. Удельная поверхностная энергия этого взаимодействия имеет тот же порядок, что и энергия взаимодействия между соседними молекулами фуллеренов в кристалле, поэтому тепловой эффект растворимости фуллеренов относительно невелик. Магнитное поле внутримолекулярного кольцевого тока в шестичленном фуллереновом кольце, ориентирует молекулу ароматического соединения таким образом, что ток внутри последней оказывается направленным навстречу току фуллеренового кольца. Энергия магнитного взаимодействия этих токов определяет положительный тепловой эффект растворения молекулы фуллерена [1].

Для количественного анализа описанных выше взаимодействий на атом-атомном уровне в настоящей работе выполнен квантовомеханический расчет энергий взаимодействия молекул фуллерена C₆₀ и трех органических растворителей – 1-хлорнафталина, хлороформа и метанола. Все три рассматриваемых растворителя широко используются в химической практике. В 1-хлорнафталеине растворимость фуллерена C₆₀ максимальна среди всех известных. Хлороформ обладает промежуточной растворяющей способностью C₆₀. В метаноле фуллерен C₆₀ практически нерастворим (табл. 2). Целью настоящей работы является установление прямой взаимосвязи между растворимостью C₆₀ в данных жидкостях и энергиями соответствующих межмолекулярных взаимодействий.

МЕТОДЫ

С целью корректного представления кольцевых токов в настоящей работе для оптимизации геометрии и вычисления энергий межмолекулярных взаимодействий ΔE_{11} в 1:1 комплексах C₆₀ с молекулами растворителей (рис. 1-3) использовалась теория Меллера-Плессета 2 порядка (MP2), учитывающая электронную корреляцию. Также применялся базисный набор 6-31 G**, рекомендованный для органических молекул. Квантовомеханические расчеты MP2 выполнялись при помощи программного пакета Gaussian09W. Количество молекул растворителя в ближайшей сольватной оболочке C₆₀ N (табл. 2) определялось методом молекулярной механики при помощи программы VegaZZ. Энергия взаимодействия C₆₀ с ближайшей сольватной оболочкой вычислялась как $\Delta E = \Delta E_{11} \cdot N$. К сожалению, прямой квантовомеханический расчет ΔE выполнить не удалось в силу его слишком высокой ресурсоемкости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчетные оптимизированные структуры исследованных в настоящей работе 1:1 комплексов, для которых вычислялись энергии межмолекулярных взаимодействий (табл. 1), представлены на рисунках 1-3.

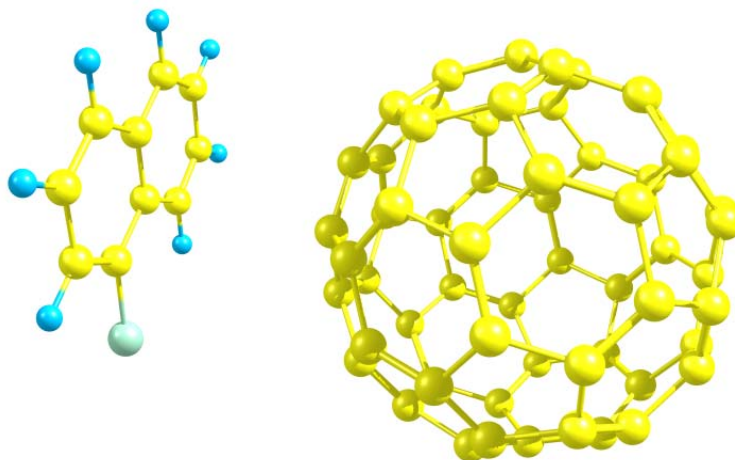


Рисунок 1. Расчетная структура 1:1 комплекса «C₆₀-1-хлорнафталин»

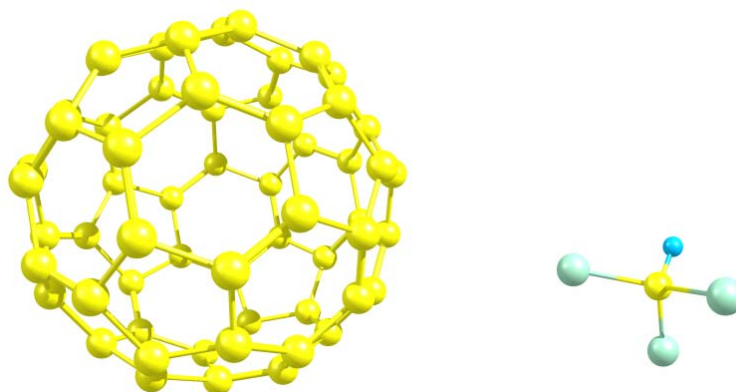


Рисунок 2. Расчетная структура 1:1 комплекса «C₆₀-хлороформ»

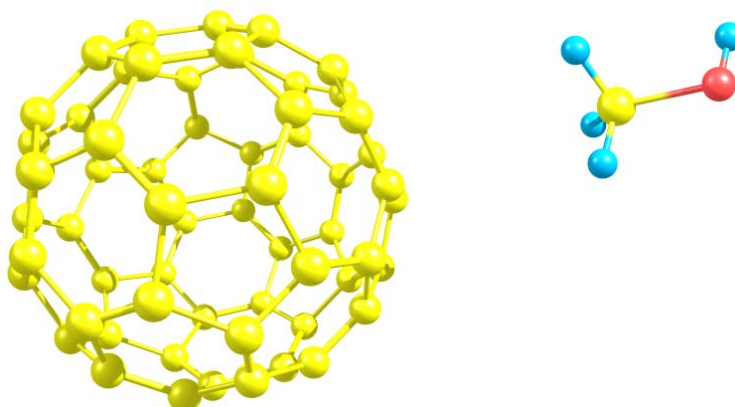


Рисунок 3. Расчетная структура 1:1 комплекса «C₆₀-метанол»

Таблица 1. Расчетные энергии молекул C₆₀, растворителей и их 1:1 комплексов (а.е.)

Комплекс	Энергия комплекса	Энергия молекулы C ₆₀	Энергия молекулы растворителя	Энергия образования комплекса ΔE_{11} , а.е.
C ₆₀ +1-хлорнафталин	-3123,31501	-2279,60525	-843,70035	-0,00940
C ₆₀ +хлороформ	-3697,00992		-1417,40206	-0,00257
C ₆₀ +метанол	-2394,98874		-115,38111	-0,00235

Как видно из таблицы 1, энергия ΔE_{11} взаимодействия C₆₀ с 1-хлорнафталином по абсолютной величине приблизительно в 4 раза больше, чем с хлороформом и метанолом, значения ΔE_{11} для которых близки между собой. По всей видимости, значительная величина ΔE_{11} в комплексе «C₆₀-1-хлорнафталин» обусловлена эффективным взаимодействием кольцевых токов в ароматических кольцах обеих молекул (см. Введение), которых не содержат хлороформ и метанол.

Таблица 2. Параметры взаимодействия C₆₀ с ближайшими молекулами растворителя и корреляции расчетных энергий взаимодействий фуллера с растворителями и экспериментальных растворимостей

Растворитель	ΔE_{11} , ккал/моль	<i>N</i>	ΔE , ккал/моль	Растворимость, г/л
1-хлорнафталин	-5,90	12	-70,8	51 [2]
Хлороформ	-1,60	30	-48,0	0,17 [3]
Метанол	-1,50	33	-49,5	0,000035 [4]
Коэффициенты корреляции энергий с растворимостями				
	-0,9999		-0,9980	

Из таблицы 2 видно, что наблюдается хорошая корреляция растворимости фуллеренов как с ΔE_{11} , так и с ΔE (знак «минус» коэффициентов корреляции обусловлен отрицательными значениями энергий, которые, в свою очередь, соответствуют энергетически выгодным образованиям комплексов, т.е. межмолекулярному притяжению). Этот результат также подтверждает предположение об определяющей роли межмолекулярных взаимодействий фуллерена с молекулами растворителя в механизме его растворимости.

Список литературы / References:

1. Безмельницын В.Н., Елецкий А.В., Окунь М.В. Фуллерены в растворах. *Успехи физических наук*, 1998, т. 168, № 11, с. 1196-1220. [Bezmelnitsyn V.N., Eletsii A.V., Okun M.V. Fullerenes in solutions. *Uspekhi fizicheskikh nauk*, 1998, vol. 168, no. 11, pp. 1196-1220. (In Russ.)]
2. Ruoff R.S., Tse D.S., Malhotra R., Lorents D.C. Solubility of fullerene C₆₀ in a variety of solvents. *J. Phys. Chem.*, 1993, vol. 97, no. 13, pp. 3379-3383.
3. Beck M.T., Mandi G. Solubility of C₆₀. *Fullerene Sci. Technol.*, 1997, vol. 5, no. 2, pp. 291-310.
4. Heymann D. Solubility of Fullerenes C₆₀ and C₇₀ in Seven Normal Alcohols and Their Deduced Solubility in Water. *Fullerene Sci. Technol.*, 1996, vol. 4, no. 3, pp. 509-515.

ANALYSIS OF THE INTERACTION OF FULLERENE C₆₀ WITH ORGANIC SOLVENTS BY QUANTUM MECHANICS METHODS

Vasiliev M.M.¹, Kostyukova L.O.²

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053

² Nakhimov Black Sea Higher Naval School

Dybenko st., 1a, Sevastopol, 299028; e-mail: lyudmilakostyukova@mail.ru

Abstract. A theoretical analysis of the interaction of the biologically active compound fullerene C₆₀ with organic solvents 1-chloronaphthalene, chloroform and methanol was carried out. Quantum-mechanical calculations of the studied molecules in the free state and in the composition of 1: 1 complexes are performed. A correlation was established between the calculated energies of the intermolecular interactions of fullerene with solvent molecules and the solubility observed in the experiment.

Key words: fullerene C₆₀, 1-chloronaphthalene, chloroform, methanol, complexation, intermolecular interaction energies, solubility.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ ПЛАТИНОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ИХ СПОСОБНОСТЬ К АССОЦИИ В РАСТВОРЕ CDSi_3

Мегер Я.В.¹, Лантушенко А.О.¹, Мухина Ю.В.¹, Яковлева Ю.А.², Ельцов О.С.²

¹ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

² ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

г. Екатеринбург, РФ

Поступила в редакцию: 31.07.2019

Аннотация. Методом ^1H и ^{195}Pt ЯМР спектроскопии в растворе была изучена агрегация платиносодержащих комплексов SAF-33, SAF-31, SAF-20 и SAF-12. Рассматриваемые молекулы содержат одинаковый гетероциклический хромофор с атомом хлора, связанным с платиной, и отличаются структурой боковых цепей: SAF-12, SAF-20 и SAF-33 содержат линейные углеводородные цепи разной длины, в то время как SAF-31 в качестве радикала содержит ароматическое кольцо с прикрепленными к нему тремя линейными углеводородными цепями. Анализ экспериментальных данных проводился с помощью четырех моделей самоассоциации. У SAF-12, SAF-20 и SAF-33 константы самоассоциации совпадают в пределах погрешности их определения, в то время как у SAF-31 данный параметр существенно выше. Сделан вывод, что константа самоассоциации изученных соединений значительно зависит от структуры их боковых цепей, при этом агрегация носит антикооперативный характер.

Ключевые слова: ЯМР спектроскопия, люминесцентные платиносодержащие комплексы, самоассоциация.

ВВЕДЕНИЕ

Самоассемблирование молекул является одной из важнейших и активно изучаемых задач ряда смежных дисциплин: молекулярной биофизики, бионанотехнологии, молекулярной биологии и других. Как правило, в основе самосборки лежат слабые нековалентные взаимодействия, управляющие формированием вторичных и третичных структур биомакромолекул, образованием биомембран, рибосом, полимераз и многих других важнейших структурных и функциональных элементов клетки. В нанотехнологии понимание принципов самоассемблирования помогает получать новые функциональные материалы с управляемыми свойствами. Примером являются исследованные в данной работе люминесцентные Pt(II) комплексы, относящиеся к новому классу функциональных материалов. Было показано, что Pt(II) комплексы проявляют свою биологическую активность путем интеркаляционного взаимодействия с ДНК [1], с другой стороны эти соединения находят разнообразные применения при создании устройств с «управляемыми» оптическими свойствами [2]. У данных молекул наблюдается эффект модуляции поглощения или излучения света за счет образования агрегатов, стабилизированных металлофильными или стэкинг-взаимодействиями. Так как у рассматриваемых комплексов люминесценция зависит от агрегации, исследование термодинамических параметров важно для управления люминесцентными свойствами. В настоящей работе исследована самоассоциация четырех люминесцентных Pt(II) комплексов методом ЯМР-спектроскопии по ядрам платины и протонам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе исследованы специально синтезируемые соединения SAF-12, SAF-20, SAF-31, SAF-33 (рис. 1). Рассматриваемые молекулы содержат одинаковый гетероциклический хромофор с атомом хлора, связанным с платиной, и отличаются структурой боковых цепей: SAF-12, SAF-20 и SAF-33 содержат линейные углеводородные цепи разной длины $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ (SAF-12), C_8H_{17} (SAF-20), $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ (SAF-33), в то время как SAF-31 в качестве радикала содержит ароматическое кольцо с прикрепленными к нему тремя линейными углеводородными цепями. Экспериментальные данные были получены методами одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии по протонам и ядрам платины. В качестве примера на рисунке 2 представлены экспериментальные зависимости протонных химических сдвигов для соединений SAF-12 и SAF-31.

Видно, что с ростом концентрации химические сдвиги всех исследованных протонов смещаются в область более сильного поля, что свидетельствует об образовании стопочных ассоциатов. Данный вывод подтверждается характером изменения химических сдвигов ядер платины: при увеличении концентрации их абсолютные значения также уменьшаются. Обращает на себя внимание отличие концентрационных зависимостей SAF31 от других исследованных молекул: на рисунке 2 в области низких концентраций изгиб кривых больше, чем у SAF12, 20, и 33, что может свидетельствовать о более высоком сродстве SAF31 к агрегации. На рисунке 3 меньшие абсолютные значения химических сдвигов ядер платины соединения SAF31 могут быть обусловлены дезэкранирующим действием ароматического кольца в боковой цепи молекулы. Анализ экспериментальных данных проводился с использованием четырех моделей агрегации [3]:

1) бесконечномерная некооперативная модель (НМ-модель), в которой предполагается, что на каждом этапе агрегации константа равновесия K не зависит от числа молекул в агрегате:

$$K_2 = \dots = K_i$$

2) бесконечномерная кооперативная модель (КМ-модель), в которой предполагается, что, начиная с тримера, константа самоассоциации отличается от значения K_2 димера на коэффициент кооперативности σ :

$$K_i = \sigma K$$

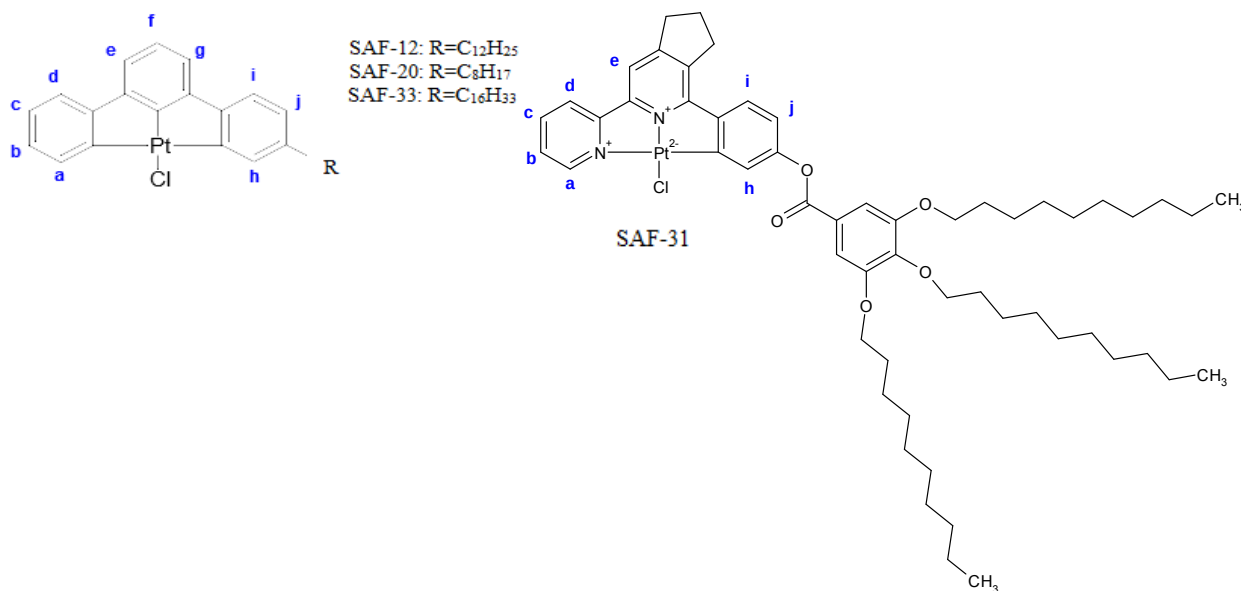


Рисунок 1. Структурная формула платиносодержащих соединений

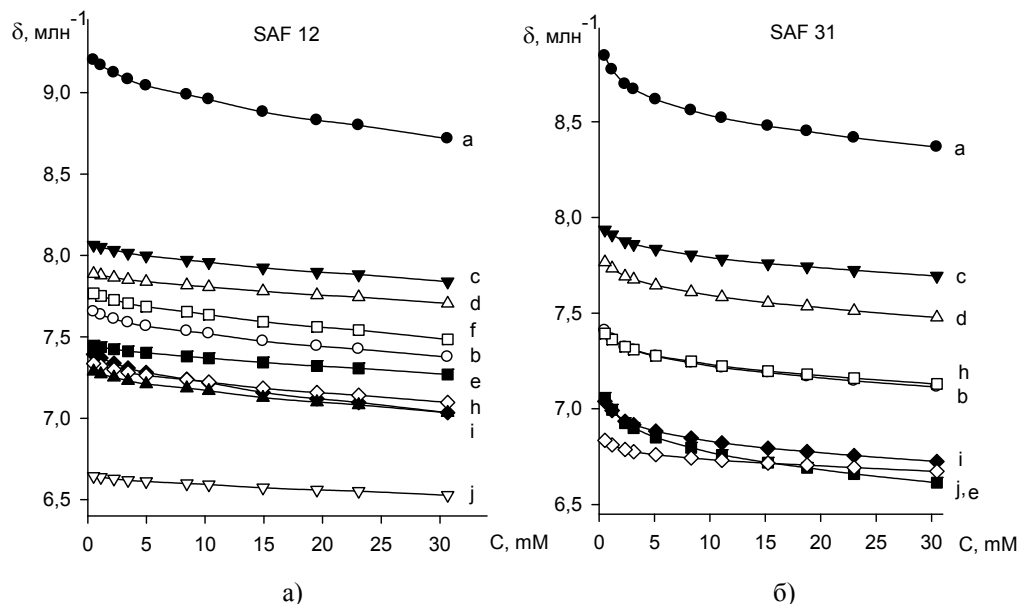


Рисунок 2. Экспериментальные концентрационные зависимости протонных химических сдвигов: а) для соединения SAF 12 и б) для соединения SAF 31

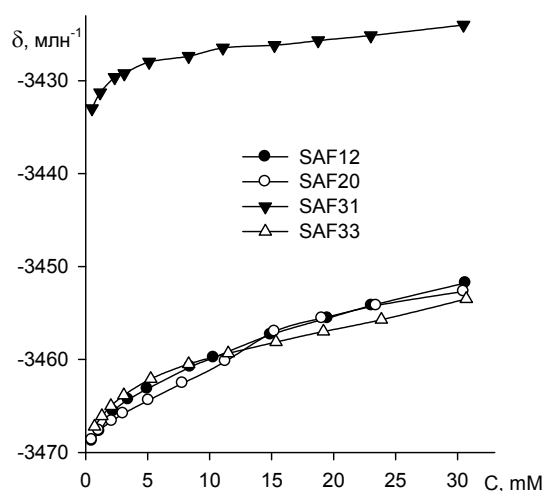


Рисунок 3. Зависимости химических сдвигов ядер платины от концентрации

3) бесконечномерная модель с затуханием (ЗТ-модель), в которой предполагается незначительное уменьшение K с ростом агрегата вследствие потери степеней свободы;

$$K_i = \frac{K_2 i^2}{4(i-1)^3}.$$

4) бесконечномерная модель с возрастанием (ВЗ-модель) в которой зависимость константы от длины агрегата задается выражением

$$K_i = \frac{K_2(i-1)}{i}.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлены значения констант, функций невязок и параметров кооперативности, полученные по четырем моделям агрегации.

Наилучшие значения функции невязки были получены при использовании НМ и ВЗ моделей. Для значений констант самоассоциации, полученных по бесконечномерной модели и для ^1H , и для ^{195}Pt выполняется соотношение $K(\text{SAF-31}) > K(\text{SAF-33}) > K(\text{SAF-20}) > K(\text{SAF-12})$.

При этом абсолютные значения K для SAF-33, SAF-20 и SAF-12 лежат в узком диапазоне 18...52 M^{-1} . Значения K для SAF-31 существенно отличаются от значений вышеперечисленных комплексов.

Таким образом, сродство к агрегации для платиносодержащих производных SAF-33, SAF-20 и SAF-12 в CDCl_3 слабо зависит от длины представленных алифатических боковых цепей, т.е. наиболее вероятно главной причиной стабилизации этих агрегатов являются дисперсионные стекинг-взаимодействия ароматических хромофоров. Данный вид взаимодействий также обуславливает, по-видимому, более высокую константу самоассоциации у соединения SAF-31, содержащего ароматическое кольцо в разветвленной боковой цепи.

С помощью ^1H и ^{195}Pt экспериментов было получено значение параметра кооперативности σ по кооперативной модели, большее единицы, при этом с возрастанием длины боковой цепи параметр

Таблица 1. Расчетные значения параметров агрегации

Модель	Параметр	SAF-33		SAF-20		SAF-12		SAF-31	
		^1H	^{195}Pt	^1H	^{195}Pt	^1H	^{195}Pt	^1H	^{195}Pt
НМ	K, M^{-1}	33,4	51	20	23	17	38	152	587
	Δ^2	1,73E-04	1,46	5,37E-04	2,26	3,63E-04	1,04	7,58E-04	1,37
КМ	K, M^{-1}	14	12	15	34	9	18	17	40
	σ	1,7	1,97	1,1	1,35	1,25	1,38	1,899	1,98
	Δ^2	3,43E-04	1,89	8,48E-04	3,79	3,71 E-04	1,03	9,04E-04	3,48
ЗТ	K, M^{-1}	84	37	30	40	22,4	50	63	152
	Δ^2	2,85E-04	1,38	9,81E-04	4,38	4,76E-04	1,21	9,98E-04	3,55
ВЗ	K, M^{-1}	88	110	64	60	52	18	282	775
	Δ^2	1,82E-04	1,71	3,53E-04	2,16	3,36E-04	1,38	1,03E-03	1,76

кооперативности возрастает. Данный результат вероятно обусловлен вкладом боковых алифатических цепей молекулы, которые препятствуют формированию агрегатов высокого порядка и были ранее описаны для разнообразных ароматических молекул с разветвленными боковыми цепями [4]. Другой антикооперативный вклад в σ возникает из-за потери степени свободы при формировании агрегата.

Важно отметить, что для получения исчерпывающей информации о природе сил, стабилизирующих ассоциаты, необходим структурный анализ, проведение которого планируется в последующих работах.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-03-00232 А.

Список литературы/ References:

1. Shahabadi N., Mohammadi S., Alizadeh R. DNA Interaction Studies of a New Platinum(II) Complex Containing Different Aromatic Dinitrogen Ligands Bioinorganic. *Chemistry and Applications*, 2011. DOI: 10.1155/2011/429241.
2. Mauro M., Aliprandi A., Cebrian C., Wang D., Kubel C., De Cola L. Self-assembly of a neutral platinum(II) complex into highly emitting microcrystalline fibers through metallophilic interactions. *Chemical Communications*, 2014, vol. 50, no. 55, pp. 69-72.
3. Beshnova D.A., Lantushenko A.O., Davies D. B., Evstigneev M.P. *Chem. Phys.*, 2009, vol. 130, pp. 90-105.
4. Evstigneev M.P., Davies D.B., Veselkov A.N. Stochastic models (cooperative and non-cooperative) for NMR analysis of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution. *Chemical physics*, 2006, vol. 321, no. 1, pp. 25-33.

EFFECT OF SIDE CHAIN STRUCTURE OF PLATINUM-CONTAINING COMPLEXES ON THEIR ASSOCIATION ABILITY IN $CDCl_3$ SOLUTION

Meger Y.V.¹, Lantushenko A.O.¹, Mukhina Yu.V.¹, Yakovleva Yu.A.², Eltcov O.S.²

¹ Sevastopol State University,
Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: lantushenko@mail.ru

² Ural Federal University
Yekaterinburg, Russia

Abstract. Aggregation of platinum-containing complexes SAF-33, SAF-31, SAF-20 and SAF-12 was studied by ^1H and ^{195}Pt NMR spectroscopy in $CDCl_3$ solution. The considered molecules contain the same heterocyclic chromophore with a chlorine atom bound to platinum and differ in the structure of the side chains: SAF-12, SAF-20 and SAF-33 contain linear hydrocarbon chains of different lengths, while SAF-31 contains an aromatic ring with three linear hydrocarbon chains attached to it. The analysis of experimental data was carried out using four models of self-association. In SAF-12, SAF-20 and SAF-33, the self-association constants coincide within the error of their determination, while in SAF-31 this parameter is significantly higher. It is concluded that the self-association constant of the studied compounds significantly depends on the structure of their side chains, while the aggregation is anticooperative.

Key words: NMR spectroscopy, luminescent platinum-containing complexes, self-association.

АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ДНК ПРИ ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КООРДИНАЦИОННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ПЛАТИНЫ, СОДЕРЖАЩИМИ АМИНОКИСЛОТЫ

Касьяненко Н.А.¹, Борисова И.В.¹, Екимов А.А.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

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

² Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А, г. Санкт-Петербург, 197376, РФ

Поступила в редакцию: 08.08.2019

Аннотация. В работе рассматривается взаимодействие высокомолекулярной ДНК с соединениями платины, содержащими дипептид D, L-аланил-L-лейцин. Проводится сравнение влияния на конформацию ДНК мооядерного и биядерного соединений. Мооядерное соединение (AL-1) содержит дипептид в виде бидентатного лиганда, присоединенного к атому платины в цис-конфигурации. В биядерном соединении (AL-2) дипептид является связующим лигандом. В цис-положении к нему находятся замещающиеся атомы хлора. Соединения являются электролитами и хорошо растворяются в воде. Методами спектрофотометрии, кругового дихроизма, вискозиметрии и атомной силовой микроскопии показано, что в условиях эксперимента соединение AL-1 не взаимодействует с молекулой ДНК, тогда как AL-2 связывается с ДНК, при этом формируется координационная связь платины с N7 гуанина в большой бороздке. Об этом свидетельствует эксперимент с протонирование ДНК после формирования ее комплексов с AL-2. Связывание проявляется как при малой, так и при большой концентрации поддерживающего электролита (NaCl). Таким образом, не только электростатические взаимодействия играют важную роль в формировании комплексов соединения AL-2 с ДНК. Обсуждается изменение конформационных параметров ДНК при связывании (объем молекулярного клубка, изгибная жесткость или персистентная длина ДНК).

Ключевые слова: ДНК, координационные соединения платины, растворы.

Химиотерапия представляет собой один из основных способов лечения онкологических заболеваний. На некоторые злокачественные новообразования можно воздействовать только посредством химиотерапии, в остальных случаях медикаментозное лечение проводят с целью контроля над развитием заболевания, для его сдерживания и облегчения симптомов.

Препараты на основе платины (цисплатин, карбоплатин и оксиплатин) являются эффективными средствами борьбы с различными видами опухолей. Однако такие препараты обладают серьезными побочными эффектами, например, высокая токсичность и низкая избирательность. Затрудняет их использование и способность клеток приобретать устойчивость к препаратам. Цитотоксическое действие соединений платины было открыто Б. Розенбергом еще в начале 1960-х годов при наблюдении влияния электрического тока на рост бактерий [1], однако лишь небольшое количество новых соединений разрешено использовать в клинике. В настоящее время продолжается синтез и испытание новых соединений платины и координационных соединений других металлов платиновой группы с целью уменьшения серьезных побочных эффектов, затрудняющих использование препаратов платины в терапии опухолей. Механизм действия препаратов платины обусловлен их взаимодействием с молекулой ДНК в клетке. Для предварительной оценки потенциальной эффективности новых соединений проводят исследование их взаимодействия с ДНК *in vitro* в модельных водно-солевых растворах. Сравнение тестируемых соединений с известным противоопухолевым препаратом цис-ДДП и его неактивным изомером транс-ДДП, который не проявляет противоопухолевой активности, позволяет выявить характерные особенности новых комплексных соединений.

Общепринятой является точка зрения, согласно которой первый и самый эффективный препарат платины – цис-дихлородиамминплатина (II) или цис-диаминдихлорплатина (II), цис-ДДП (препарат цисплатин) образует координационную связь с азотистыми основаниями ДНК. При этом наблюдается ярко выраженная избирательность к GC-парам [2-4]. Связывание комплексного иона платины с ДНК включает в себя стадию акватации — замещения хлора в координационной сфере платины на воду с образованием комплексных ионов $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$ или $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Последующее замещение воды на входящий атом N7 гуанина или N7 аденина, которые находятся в большой бороздке ДНК, приводит к формированию инертного комплекса. Присоединение к аденину было обнаружено только на второй стадии связывания цис-ДДП с ДНК, то есть уже после того, как N7 атом гуанина вошел в координационную сферу платины [8].

Комплексы цис-ДДП с ДНК могут представлять собой бифункциональные аддукты с образованием как межнитевых, так и внутринитевых сшивок [5-8]. Возможно также образование монофункциональных аддуктов.

Одним из направлений модификации соединений платины является введение пептидов в координационную сферу комплексобразующего иона. Действительно, в естественных условиях взаимодействие между белками и нуклеиновыми кислотами осуществляются на всех этапах репликации ДНК, а также в ходе многочисленных процессов клеточной саморегуляции. В связи с этим правильный выбор пептидов может обеспечить хорошее

сродство препаратов с ДНК. Известно несколько возможных типов взаимодействий между пептидами и нуклеиновыми кислотами [9]: электростатическая связь между фосфатными группами и положительно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков (лизина, гуанидиновой группы аргинина и протонированным остатком гистидина); водородная связь между фосфатными группами, нуклеотидами, углеводными частями нуклеиновых кислот и протон-донорными и протон-акцепторными группами пептида; стэкинг-взаимодействие между боковыми группами остатков ароматических аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина, гистидина) и нуклеотидами по механизму, аналогичному интеркаляции; гидрофобные взаимодействия 5-метил цитозина и тимина с неполярными боковыми группами пептидов. Комплексы платины (II), имеющие в составе аминокислоты или пептиды, привлекают внимание из-за своей способности снижать токсичность препаратов [9-11]. Введение пептидных лигандов может изменить цитотоксические свойства известных препаратов [11].

В работе для изучения взаимодействия соединений платины с ДНК использовали методы вискозиметрии, кругового дихроизма, спектрофотометрии и атомной силовой микроскопии. По изменению вязкости растворов ДНК можно зафиксировать изменение объема молекулярного полимерного клубка. В работе определяли величину относительной вязкости раствора $\eta_r = \eta/\eta_0$, где η — вязкость раствора, η_0 — вязкость растворителя. Величину $\eta_r - 1 = \eta_{\text{sp}}/c$ называют удельной или специфической (η_{sp}) вязкостью. Она зависит от концентрации раствора, поэтому более корректно использовать приведенную вязкость $\eta_{\text{пр}} = \frac{\eta_r - 1}{c}$. К молекулам

высокомолекулярной ДНК в растворе можно применить модель свободно-сочлененной цепи, состоящей из одинаковых статистических сегментов длиной A (длина сегмента Куна, которая является мерой термодинамической жесткости полимера). Для полимерных клубков, у которых за линейный размер принимается среднеквадратичное расстояние между концами цепи $\langle h^2 \rangle^{1/2}$, справедлива формула Флори,

$$[\eta] = \frac{\Phi \langle h^2 \rangle^{3/2}}{M},$$

где Φ — константа Флори; M — молекулярная масса. Величина характеристической вязкости $[\eta]$ определяется из концентрационной зависимости приведенной вязкости растворов экстраполяцией к $C = 0$.

Метод вискозиметрического титрования основан на измерении вязкости растворов ДНК одинаковой концентрации с постепенно увеличивающейся концентрацией соединения, вступающего с ДНК во взаимодействие. Метод удобен тем, что позволяет быстро оценить наличие изменений в макромолекулярных параметрах ДНК при взаимодействии. По данным эксперимента строится зависимость относительного изменения приведенной или специфической вязкости раствора от концентрации вводимого вещества. Постоянство значений специфической вязкости в таком эксперименте может свидетельствовать как об отсутствии взаимодействия, так и о реализации внешнего (бороздочного) связывания, при котором не происходит изменения макромолекулярных параметров. Для исключения одной из двух возможных ситуаций необходимы дополнительные исследования, например, спектральными методами. Увеличение приведенной вязкости ДНК может происходить как в результате возрастания контурной длины и/или длины сегмента, так и в результате изменения межмолекулярного взаимодействия и появления межмолекулярных ассоциатов. Можно утверждать, что при интеркационном связывании специфическая вязкость при постоянной концентрации макромолекулы должна увеличиваться, но обратное утверждение в общем случае неверно, и для доказательства существования интеркаляции требуются дополнительные исследования, например, параллельное измерение характеристической вязкости и оптической анизотропии макромолекулы. При уменьшении размеров клубка за счет экранирования зарядов фосфатов может наблюдаться падение приведенной вязкости раствора. В работе использовали модифицированный ротационный вискозиметр типа Зимма-Крозерса [12]. АСМ изображения были получены с использованием атомного силового микроскопа NTEGRA (ресурсный центр Нанотехнологий СПбГУ). Измерения спектров кругового дихроизма проводили в кварцевых кюветах длиной $l = 1$ см с помощью автодихрографа Mark IV (Франция). Измеряли разность молярных коэффициентов экстинкции циркуляно-поляризованных волн $\epsilon_L - \epsilon_R = \Delta\epsilon$ (для левой и правой поляризации соответственно) в зависимости от длины волны падающего света. Величина $\Delta\epsilon$ измеряется в области поглощения хромофоров. В полипептидных цепях и белках специфическими хромофорами являются пептидная связь, аминокислоты с боковыми гетероциклическими радикалами (тирозин, фенилаланин, триптофан) и цистеин. Для ДНК хромофорами являются азотистые основания.

В работе рассматривается взаимодействие молекулы ДНК с моно- и биядерными платиновыми комплексами, содержащими дипептиды (рис. 1).

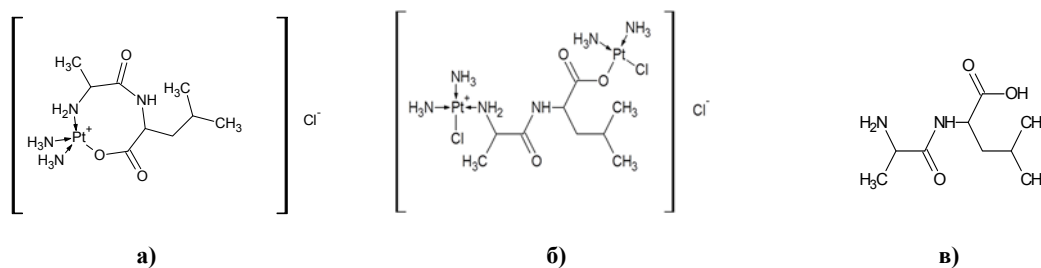


Рисунок 1. Структура используемых в работе соединений: AL-1 (а), AL-2 (б) и лиганд (в), входящий в состав соединений (AL)

Как видно из рисунка 1, соединение $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{AL}]\text{Cl}$, обозначенное AL-1, представляет собой мооядерный комплекс платины с бидентатным лигандом, обозначенным как AL (это D,L-аланил-L-лейцин). Соединение $\text{cis-}[\text{Pt}_2(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2\text{AL}]\text{Cl}$, обозначенное как AL-2, – это биядерный комплекс платины. Лиганд AL является общим для двух атомов платины, а в цис-положении к нему у каждого атома платины находится уходящий атом хлора. Все соединения синтезированы в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете.

На рисунке 2 приведены спектры УФ поглощения и кругового дихроизма ДНК в комплексах с соединениями AL-1 и AL-2. Видно, что при использовании двоядерного комплекса платины наблюдается заметное изменение спектров поглощения и кругового дихроизма ДНК, тогда как мооядерный комплекс влияет на них очень мало.

Измерение приведенной вязкости растворов ДНК с ростом концентрации соединений AL-1 и AL-2 (рис. 3 а) также показало различие во влиянии этих соединений на конформацию ДНК. Если соединение AL-1 практически не вызывает изменения вязкости, то в случае AL-2 реализуемое взаимодействие отражается в существенном падении вязкости растворов ДНК.

Взаимодействие AL-2 с ДНК наблюдается даже в растворах с большой концентрацией поддерживающего электролита (1 М NaCl), когда полиэлектролитное набухание ДНК полностью подавлено. Отсюда следует, что AL-1, по-видимому, не взаимодействует с ДНК в условиях эксперимента, тогда как AL-2 связывается с макромолекулой. При этом не только электростатические силы обеспечивают связывание. Это связывание вызывает изменение спектральных свойств ДНК и падение объема молекулярного клубка в результате уменьшения жесткости макромолекулы (в 1 М NaCl падение вязкости может быть вызвано только этой причиной).

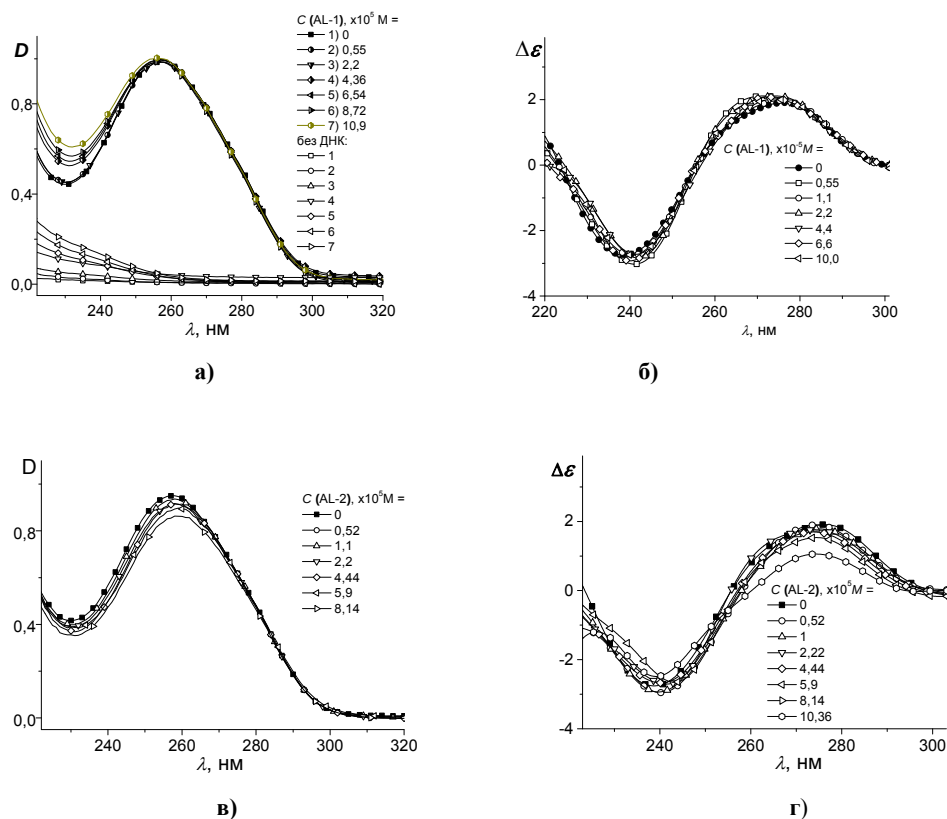


Рисунок 2. Спектры поглощения (а, в) и кругового дихроизма (б, г) ДНК в растворе 0,005 М NaCl при добавлении соединения AL-1 (а, б) и AL-2 (в, г). Для соединения AL-2 на рисунке в) приведены вычисленные спектры поглощения ДНК (вычтен вклад соединения в суммарный спектр). Концентрации соединений указаны на рисунке

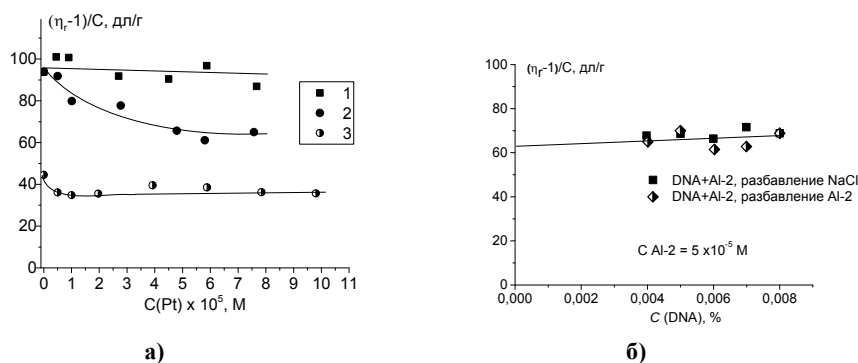


Рисунок 3. а) Зависимость приведенной вязкости растворов ДНК от концентрации соединений Al-1 (1) и Al-2 (2, 3) в 0,005 M NaCl (1, 2) и в 1 M NaCl (3); б) зависимость приведенной вязкости растворов от концентрации ДНК при двух способах разбавления исходного раствора (пояснения в тексте)

Мы провели эксперимент с разным разбавлением готового раствора, содержащего комплексы ДНК с соединением AL-2, при определении характеристической вязкости ДНК (рис. 3 б). Предварительно этот раствор выдерживали сутки при температуре 4°C, чтобы сформировались координационные связи платины с ДНК. Если реализуется равновесное связывание, когда для определения характеристической вязкости ДНК надо специально поддерживать постоянным соотношение между связанными и свободными лигандами в растворе ДНК, используемые способы разбавления приводят к разным зависимостям. Если же реализуется координационная связь, она не успевает разрушиться (а новые связи не успевают образоваться) при намеренном изменении соотношения между свободными и связанными с ДНК молекулами Al-2. Это и наблюдалось в нашем эксперименте. При разбавлении исходного раствора растворителем 0,005 M NaCl, сохранялось постоянным отношение $C(Pt)/C(ДНК)$. А при использовании раствора Al-2 в 0,005 M NaCl той же концентрации, что и в исходном растворе, мы сохраняли постоянной $C(Pt)$. Одинаковый ход зависимости указывает, что реализовалось сильное связывание AL-2 с ДНК. Можно говорить о формировании координационной связи.

Как показал эксперимент, свободный лиганд AL с ДНК не взаимодействует. Это следует и из спектральных данных, и из вискозиметрии (данные не показаны). Характер изменения спектральных свойств ДНК указывает на связывание соединения с ДНК в большой бороздке. По-видимому, в комплексообразовании участвует группа N7 гуанина. Действительно, при связывании положительно заряженных соединений с ДНК по этой позиции, в том числе и координационных соединений платины, наблюдается гипохромный эффект и батохромный сдвиг полосы поглощения ДНК [13, 14]. Такую тенденцию мы видим на рисунке 2 в. Отсюда можно полагать, что соединение AL-2 также формирует координационную связь с N7 гуанина. Для проверки этого предположения мы рассмотрели процесс протонирования двуспиральной ДНК после формирования ее комплексов с AL-1 и AL-2 (рис. 4). Известно, что протонирование двуспиральной ДНК на первом этапе происходит по положению N7 гуанина в большой бороздке. Это сопровождается характерным изменением спектра КД ДНК (см. рис. 4). После формирования комплексов ДНК с AL-2 протонирования ДНК не наблюдается (позиция N7 гуанина занята связыванием с AL-2). Напротив, присутствие в растворе ДНК соединения AL-1 не препятствует протонированию макромолекулы, то есть в этом случае позиция N7 гуанина остается свободной. Отсюда следует, что соединение AL-1 не связывается с ДНК, с соединением AL-2 формирует комплекс, при этом платина координирована к N7 гуанина. Следует заметить, что из структуры соединения AL-2 следует возможность замещения одного или двух

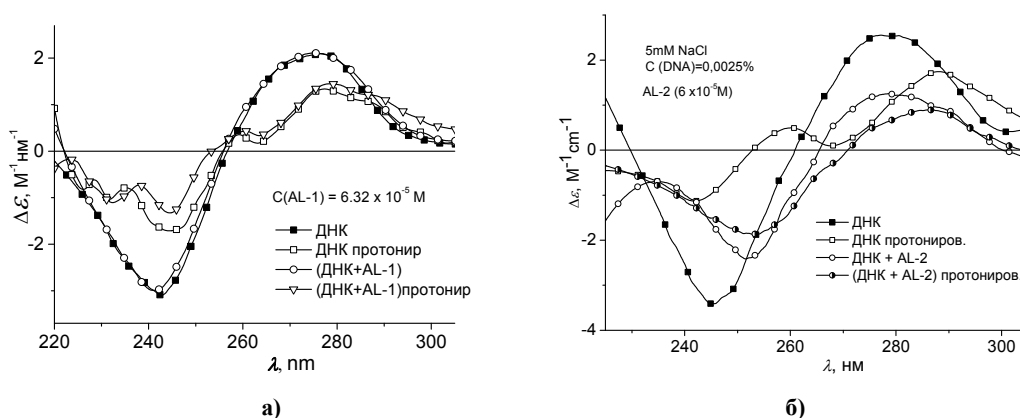


Рисунок 4. Спектры кругового дихроизма ДНК и ее комплексов с Al-1 (а) и AL-2 (б) в 0,005 M NaCl при нейтральных рН и при $pH = 4,25 \pm 0,05$

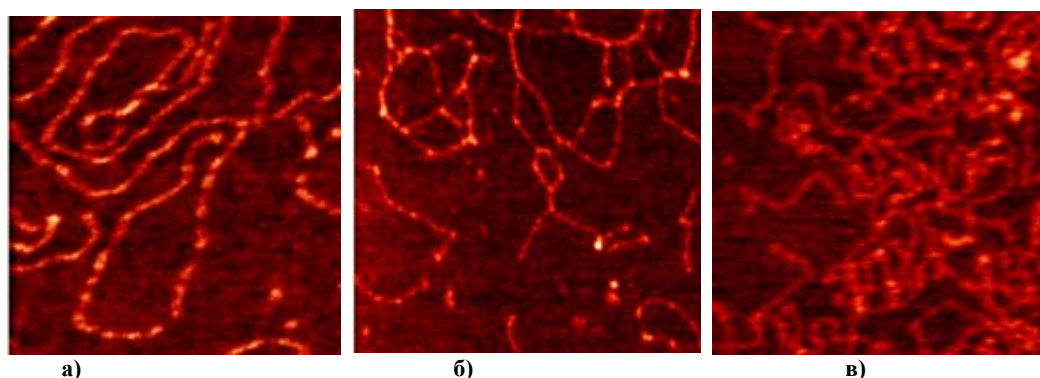


Рисунок 5. АСМ изображения ДНК (а), ДНК в комплексе с Al-1 (б) и с AL-2 (в). Размер изображений 500 нм × 500 нм

атомов хлора на воду с последующим вхождением гетероциклического атома азота оснований ДНК. У соединения AL-1 такой возможности нет, так как координационная сфера платины занята инертными лигандами.

Метод атомной силовой микроскопии (АСМ) позволяет визуализировать комплексы ДНК с соединениями платины. На рисунке 5 приведены АСМ изображения ДНК при связывании с AL-1 и AL-2. Хорошо видно, что комплексообразование с AL-2 приводит к компактизации макромолекул.

Суммируя полученные в работе данные, можно заключить, что биядерное соединение платины взаимодействует с ДНК, формируя координационную связь платина-ДНК в большой бороздке с атомом N7 гуанина. Мы полагаем, что связывание приводит к уменьшению термодинамической жесткости ДНК, в результате чего макромолекула приобретает меньший объем и более «запутанную» форму. Моноядерное соединение платины в условиях эксперимента с молекулой ДНК не взаимодействует. По-видимому, это обусловлено структурой координационной сферы платины, содержащей только инертные лиганды, не склонные к замещению.

Список литературы / References:

1. Rosenberg B., Vancamp L., Trosko J. E., Mansour V. H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, 1969, vol. 222, pp. 385-386.
2. Pinto A.L., Lippard S.J. Binding of the antitumor drug cis- diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 780, pp. 167-180.
3. Zamble D.B., Mu D., Reardon J.T., Sancar A., Lippard S.J. Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, pp. 10004-10013.
4. Reedijk J., Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem. Commun.*, 1996, vol. 7, pp. 801-806.
5. Fichtinger-Schepman A.M., van der Veer J.L., den Hartog J.H., Lohman P.H.M., Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis- diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, 1985, vol. 24, pp. 707-713.
6. Brabec V., Kleinwächter V., Butour J.L., Johnson N.P. Biophysical studies of the modification of DNA by antitumour platinum coordination complexes. *Biophys. Chem.*, 1990, vol. 35, pp. 129-141.
7. Касьяненко Н.А., Богданов А.А., Дефрене С. Взаимодействие молекулы ДНК с координационными соединениями платины и кобальта в растворе. *Биофизика*, 2002, т. 47, с. 449-452. [Kasyanenko N.A., Bogdanov A.A., De fresne S. Interaction of DNA molecule with coordination compounds of platinum and cobalt in solution. *Biofizika*, 2002, vol. 47, pp. 449-452. (In Russ.)]
8. Barnham K.J., Bernens-Price S.J., Frenkiel T.A., Frey U., Sadler P.J., Platination Pathways for Reactions of Cisplatin with GG Single-Stranded and Double-Stranded Decanucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, vol. 34, pp. 1874-1877.
9. Luscombe N.M., Laskowski R.A., Thornton J.M. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, pp. 2860-2874.
10. Chardon E., Dahm G., Guichard G., Bellemin-Lapponnaz S. Derivatization of Preformed Platinum N-Heterocyclic Carbene Complexes with Amino Acid and Peptide Ligands and Cytotoxic Activities toward Human Cancer Cells. *Organometallics*, 2012, vol. 31, pp. 7618-7621.
11. Moradell S., Lorenzo J., Rovira A., van Zutphen S., Avilés F. X., Moreno V., de Llorense R., Martinez M.A., Reedijk J., Llobeta A. Water-soluble platinum(II) complexes of diamine chelating ligands bearing amino-acid type substituents: the effect of the linked amino acid and the diamine chelate ring size on antitumor activity, and interactions with 5'-GMP and DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, vol. 98, pp. 1933-1946.
12. Frisman E.V., Schagina L.V., Vorobiev V.I. A glass rotation viscometer. *Biorheology*, 1965, vol. 2, pp. 189-194.

13. Kas'ianenko N.A., Valueva S.V., Smorygo N.A., D'iachenko S.A., Frisman E.V. Study of the interaction of a DNA molecule with coordination compounds of divalent platinum I. Effect of cis-diaminodichloroplatinum on molecular parameters of DNA in solution. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 1995, vol. 29, pp. 345-353.
14. Kas'ianenko N.A., Karymov M.A., D'iachenko S.A., Smorygo N.A., Frisman E.V. Interaction of DNA molecules with divalent platinum coordination complexes. II. Effect of the nature and location of ligands in the first platinum coordination sphere. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 1995, vol. 29, pp. 585-596.

ANALYSIS OF CHANGE IN DNA CONFORMATION IN COMPLEXES WITH COORDINATION PLATINUM COMPOUNDS CONTAINING AMINO ACIDS

Kasyanenko N.A.¹, Borisova I.V.¹, Ekimov A.A.²

¹ St. Petersburg State University

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

² St. Petersburg State University of Pharmaceutical Chemistry

st. Professor Popov, 14, lit. A, St. Petersburg, 197376, Russia

Abstract. The interaction of high molecular DNA with platinum compounds containing the dipeptide D, L-alanyl-L-leucine was studied. The influence of mononuclear and binuclear platinum compounds on DNA conformation in a solution was compared. The mononuclear compound (AL-1) contains a dipeptide in the form of a bidentate ligand attached to the platinum atom in a cis configuration. In the binuclear compound (AL-2), the dipeptide is a common ligand for two platinum atoms. The chlorine atom is in the cis position to this ligand for each platinum atom in AL-2. Compounds are electrolytes and are highly soluble in water. It was shown by the methods of spectrophotometry, circular dichroism, viscometry, and atomic force microscopy, that under the experimental conditions the AL-1 compound does not interact with the DNA molecule, while AL-2 binds to DNA with the coordination of a platinum atom to N7 guanine in the major groove. This is evidenced by an experiment with DNA protonation, that after the formation of DNA complexes with AL-2, the N7 guanine is not available to other agents. Binding appears at both low and high concentrations of supporting electrolyte (NaCl). Thus, not only electrostatic interactions play an important role in the formation of complexes of AL-2 with DNA. The change in the conformational parameters of DNA upon binding (molecular coil volume, bending stiffness or persistent length of DNA) is discussed.

Key words: DNA, platinum coordination compounds, solutions.

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМОРФНОГО ДИОКСИДА КРЕМНИЯ, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ НЕФЕЛИНА, И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТА

Веляев Ю.О.¹, Кометиани И.Б.², Булатникова Е.А.²

¹ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, Российская Федерация; e-mail: velyaevyo@yandex.ru

² ФГБОУ ВО «Курский государственный университет»

ул. Радищева, 33, г. Курск, 305000, Российская Федерация

Поступила в редакцию: 12.08.2019

Аннотация. В статье представлены результаты исследований некоторых физико-химических характеристик аморфного высокочистого диоксида кремния, полученного из нефелинового концентрата методом сернокислотной дегидратации кремнезёмсодержащего раствора, который в свою очередь был получен из нефелина после его вскрытия 25-30% H_2SO_4 . Приведены данные по морфологии поверхности полученного SiO_2 , а также доказана его химическая чистота методом рентгеноспектрального микроанализа. Изучены структурно-поверхностные свойства SiO_2 , полученного из нефелина. Приведены данные по удельной поверхности данного кремнезёма ($376-469 \text{ м}^2/\text{г}$) в сравнении с существующими аналогами, в том числе использующимися в качестве основного действующего препарата в лекарственных препаратах – энтеросорбентах. Проведено исследование распределения удельного поверхностного заряда у нефелинового кремнезёма в сравнении с образцом фармацевтического препарата "Полисорб МП" методом Паркса. Показана аналогичность картин данного распределения для обоих образцов с точкой нулевого заряда при $pH=9,588$, что, видимо, обусловлено похожим поверхностным распределением силанольных групп на поверхности этих кремнезёмов. Приведённые результаты работы позволяют прогнозировать возможность использования данного образца диоксида кремния, полученного из нефелинового концентрата, в качестве основы для медицинских препаратов сорбирующего действия.

Ключевые слова: нефелин, аморфный диоксид кремния, сорбция, энтеросорбенты.

Одной из современных задач, которая стоит перед фармацевтической промышленностью, является создание новых энтеросорбентов, используемых в пред- и послеоперационный период терапии онкологических больных, устраняя последствия лучевой и химиотерапии [1], при попадании токсических веществ в желудочно-кишечный тракт, при аллергии или после курса противопаразитарного лечения в качестве детоксиканта, а также способствующих улучшению деятельности органов пищеварения и организма в целом [2, 3]. Одними из современных энтеросорбентов нового поколения является кремнийсодержащие препараты (белая глина, смекта, полисорб, белый уголь, неосмектин, энтеросгель, энтеросорб и другие) [4-6]. Для большинства перечисленных фармацевтических препаратов характерно использование в качестве основного действующего компонента аморфного диоксида кремния, который получают из реактивного сырья. Действие кремнезёмных энтеросорбентов заключается в адсорбции поверхностью активного компонента токсикантов из реакционной среды. Таким образом важную роль для кремниевой основы сорбентов играет их поверхностная активность, которая для кремнезёмов в большей степени обусловлена наличием силанольных групп [7]. Также важным показателем для сорбентов является удельная поверхность. Обычно этот параметр для SiO_2 , используемого в качестве основы для адсорбирующих препаратов, составляет величину в районе $300-450 \text{ м}^2/\text{г}$.

Основными поставщиками современной основы для энтеросорбентов являются две немецкие компании. Одной из этих корпорация является компания Evonik, которая выпускает товарную продукцию AEROSIL® 200 Pharma и AEROPERL® 300 Pharma с удельной поверхностью в интервале от 175 до $320 \text{ м}^2/\text{г}$. Вторая компания это Wacker Chemie AG, которая производит пирогенный кремнезём, с разными показателями удельной поверхности. На постсоветском пространстве производством кремнезёма, подходящего по своим техническим параметрам под применение в качестве основы для лекарственных препаратов, занимаются предприятия ГП «Калушский опытно - экспериментальный завод Института химии поверхности Национальной академии наук Украины» (получаемый пирогенный кремнезём обладает удельной поверхностью в интервале от 200 до $300 \text{ м}^2/\text{г}$, и ООО «Экокремний», продукция которого больше направлена на реализацию в сельскохозяйственной отрасли в качестве энтеросорбентов для животных, а также некоторые другие предприятия. Большинство производителей кремнезёма работают на реактивном сырье, которым являются либо четырёххлористый углерод, либо кремнийорганические соединения.

Снижение стоимости конечного продукта для повышения его конкурентоспособности на рынке возможно либо за счёт упрощения и совершенствования технологической схемы получения, либо за счёт внедрения новой технологии, работающей на дешёвом исходном сырье. Таким исходным сырьём может быть нефелин – алюмосиликатный минерал $((Na,K)_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 2SiO_2)$, который получают в качестве попутного продукта при обогащении апатито-нефелиновых руд в ОАО «Апатит» (г. Кировск, Мурманская обл.), который практически не используется и складывается в виде нефелиновых «хвостов» в огромных количествах не далеко от места его производства, что существенно ухудшает, в виду его мелкодисперсности, экологическую обстановку в регионе.

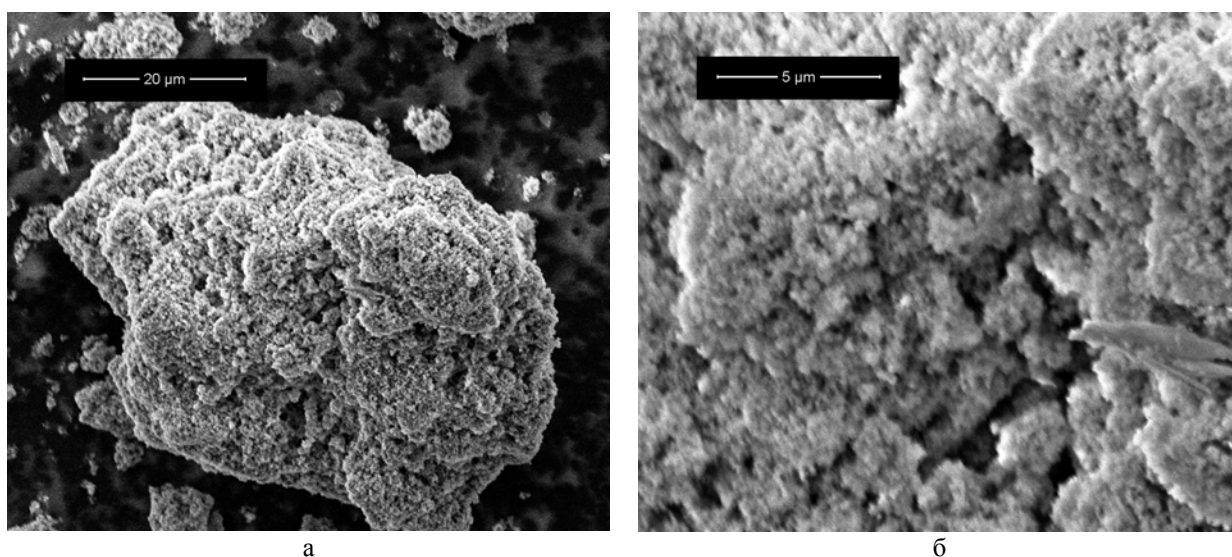
Таблица 1. Структурно-поверхностные свойства аморфного диоксида кремния, полученного из нефелина по сернокислотной технологии его переработки

Параметр	Образец	K30	K60	K90	K120	K150
Время загрузки, мин		30	60	90	120	150
Удельная поверхность по методу БЭТ, м ² /г		469	422	405	382	376
Удельная поверхность микропор ($d < 1.7$ нм), м ² /г		25,34	17,32	17,37	18,57	20,61
Ширина пор по методу БЭТ, нм		7,98	8,36	9,62	9,86	9,47
Диаметр пор по методу ВЈН (десорбция), нм		8,26	7,63	9,31	9,51	9,67
Средний диаметр частиц ($d = 6/(S_{уд.} \cdot \rho)$ ($\rho = 2200$ кг/м ³), нм		5,8	6,5	6,7	7,1	7,2

Нефелин обладает рядом уникальных свойств, таких как постоянство химического состава и способность к разложению практически всеми минеральными и даже некоторыми органическими кислотами. В процессе кислотного разложения в раствор переходят как входящие в его состав Na, K и Al, так и диоксид кремния [8] (в виде ортокремниевой кислоты). Учёными ИХТРЭМС КНЦ РАН разработана технология получения аморфного диоксида кремния из нефелина путём его разложения 25-30% серной кислотой, дальнейшим отделением из полученной пульпы нерастворимого минерального осадка и смеси алюмокалиевых и алюмонатриевых квасцов и последующей капельной дегидратации полученного кремнезёмсодержащего раствора в 75-98% серной кислоте [9, 10]. После чего полученный кремниевый коагулянт промывается дистиллированной водой до полного удаления сульфат иона и сушится при температуре 105°C. Полученный таким образом кремнезём обладает структурно-поверхностными свойствами, представленными в таблице 1 [11]. Из приведённой таблицы можно сделать вывод, что из нефелинового концентрата может быть получен ряд кремнезёмных продуктов с заданной удельной поверхностью в интервале от 376 до 469 м²/г, что даже больше, чем удельная поверхность существующих основ для энтеросорбентов.

Авторами данной работы с помощью растрового электронного микроскопа Quanta FEG 650 с приставкой рентгеновского микроанализа EDAX (ООО «МНТЦ», г. Курск) была исследована морфология (рис. 1 а, б) и химический состав (рис. 2) полученного из нефелина диоксида кремния (для исследования был взят образец K150, как наиболее близкий по удельной поверхности к диоксиду кремния, используемому в выпускаемых на сегодняшний день энтеросорбентах).

Данные морфологического анализа показали, что объект исследования представлен в основном бесформенными агломератами, образованными частицами диаметром порядка 98-154 нм. Показана химическая чистота данного кремнезёма. На спектре, показанном на рисунке 2, чётко показаны два пика, характеризующие наличие в изучаемой области образца только атомов кремния и кислорода. Малоаметный пик углерода слева от линии кислорода можно объяснить его сорбцией в небольших количествах из атмосферного воздуха исследуемым кремнезёмом, а также захватом части подложки, которая представляет из себя углеродный скотч.

**Рисунок 1.** Морфология K150 с разным увеличением, раз: а – 4000, б – 16000

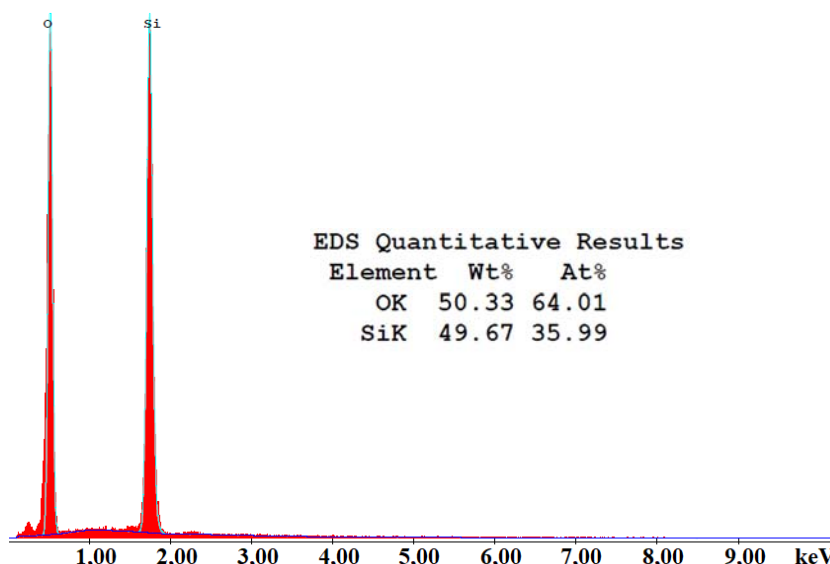


Рисунок 2. Данные рентгеноспектрального микроанализа образца K150

Как известно, способность к сорбции для кремнезёмов в основном имеет электростатическую природу благодаря особенностям поверхностного расположения силанольных групп. Для прогнозирования эффективности применения полученного из нефелина кремнезёма в качестве действующего вещества для энтеросорбентов, было изучено распределение удельного поверхностного заряда образца K150 (рис. 3.а) в сравнении с промышленным образцом энтеросорбента «Полисорб МП» (рис. 3.б) с помощью потенциометрического титрования по методу Паркса, проведённого по известной методике [12, 13]. Перед титрованием оба образца подвергались высушиванию при 105°C в течении 2 часов для удаления физически связанной из окружающей атмосферы воды. Результаты титрования показали очень близкую картину распределения поверхностного заряда для обоих порошков с точкой нулевого заряда при $\text{pH} = 9,588$ с небольшим отклонением в области отрицательных зарядов, что логично для образцов кремнезёма, полученных разными способами.

Далее была изучена способность экспериментального кремнезёма к сорбции катионов Fe^{3+} и соляной кислоты. Для этого заранее готовились модельный растворы с заданной концентрацией данных объектов. Затем отбирались заданные навески обеих кремнезёмов и засыпались в приготовленные модельные растворы. Полученная пульпа подвергалась выдерживанию в течении некоторого времени, при этом через равные промежутки времени отбирались пробы растворов, в которых соответственно определялся либо катион железа, либо HCl . Исходная концентрация модельного раствора соляной кислоты составляла 0,2 моль/л, а катионов Fe^{3+} – 0,5 моль/л. Данные по сорбции проиллюстрированы на рисунках 4 и 5. Исследования показали, что максимальная степень сорбции была достигнута навеской кремнезёма 2 г и составляла соответственно 57% и 17% для ионов Fe^{3+} и соляной кислоты.

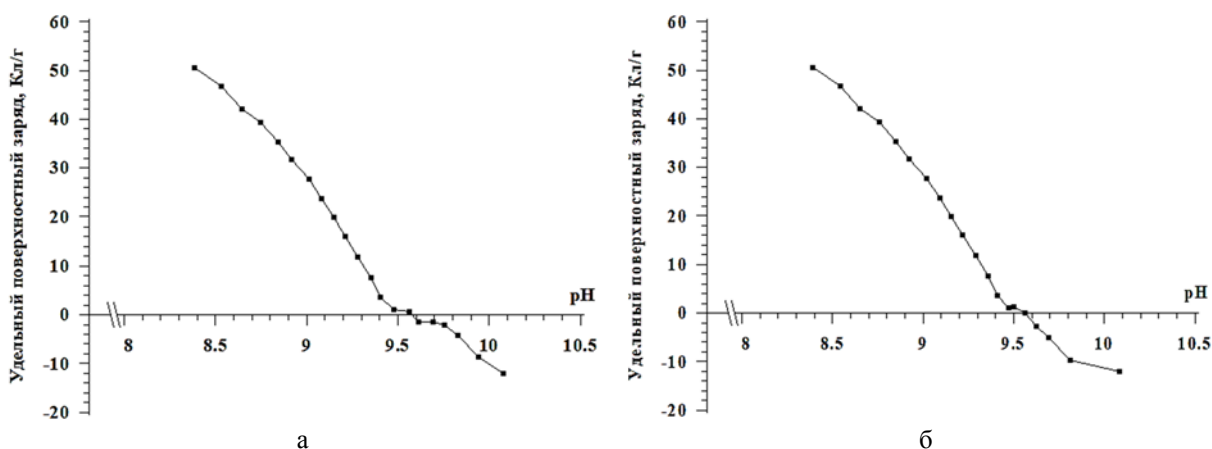


Рисунок 3. Зависимость распределения удельного поверхностного заряда от pH среды для образца: а – K150; б – «Полисорб МП»

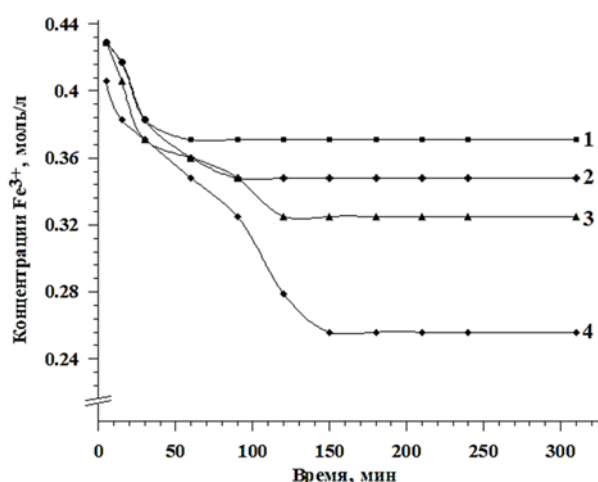


Рисунок 4. Кинетика сорбции Fe^{3+} аморфным диоксидом кремния K150, массой, г: 1 – 0,5; 2 – 1; 3 – 1,5; 4 – 2

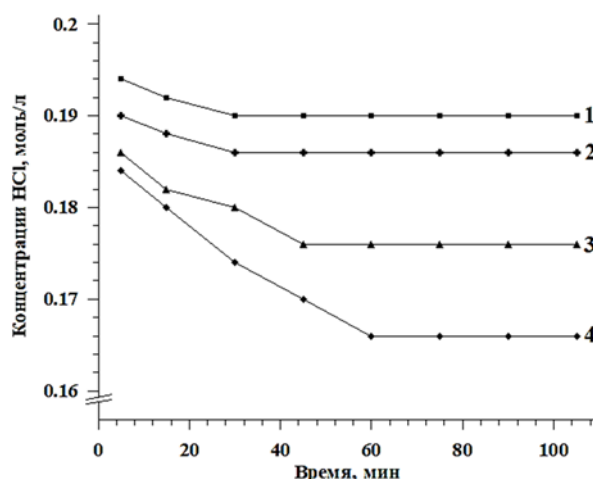


Рисунок 5. Кинетика сорбции HCl аморфным диоксидом кремния K150, массой, г: 1 – 0,5; 2 – 1; 3 – 1,5; 4 – 2

Таким образом, по результатам представленных исследований можно сделать вывод о возможности использовании аморфного высокочистого диоксида кремния, полученного из нефелинового концентрата, в качестве основного действующего компонента для энтеросорбентов, который благодаря развитой удельной поверхности и близкому к существующим промышленным аналогам распределению удельного поверхностного заряда, будет сорбировать традиционные для энтеросорбентов токсиканты.

Список литературы / References:

1. Калев О.Ф., Коробкин А.В., Захарова М.Н. Полисорб МП при энтеропатии и проявлениях токсичности химиотерапии у больных острым миелобластным лейкозом. *Врач*, 2007, № 10, с. 46-48. [Kalev O.F., Korobkin A.V., Zaharova M.N. Polisorb MP in enteropathy and manifestations of chemotherapy toxicity in patients with acute myeloblastic leukemia. *Vrach*, 2007, no. 10, pp. 46-48. (In Russ.)]
2. Piskun R.P., Pentyuk A.A., Serkova V.K., Polesya T.L., Savitskay E.A. Enterosorbents in the treatment of atherosclerosis. *Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya*, 1998, vol. 61, no. 2, pp. 72-74.
3. Меньшикова С.В., Кетова Г.Г., Попилов М.А., Малоизвестные свойства полисорба. *Токсикология*, 2018, № 1 (59), с. 32-34. [Men'shikova S.V., Ketova G.G., Popilov M.A. Little-known properties of Polisorb. *Toksikologiya*, 2018, no. 1 (59), pp. 32-34. (In Russ.)]
4. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния*, под ред. акад. НАН Украины Чуйко А.А., Киев, Наукова думка, 2003, 416 с. [Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide, pod red. akad. NAN Ukrainy Chujko A.A., Kiev, Naukova dumka, 2003, 416 p. (In Russ.)]
5. Markelov D.A., Nitsak O.V., Gerashchenko I.I., Comparative study of the adsorption activity of medicinal sorbents. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2008, vol. 42, no. 7, pp. 405-408.
6. Reshetnikov V.I. Evaluation of the adsorption capacity of enterosorbents and related medicinal preparations, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2003, vol. 37, no. 5, pp. 246-251.
7. Чукин Г.Д. *Химия поверхности и строение дисперсного кремнезёма*. М.: Типография Паладин, ООО «Принта», 2008, 172 с. [Chukin G.D. *Surface chemistry and structure of dispersed silica*. М.: Tipografiya Paladin, ООО «Printa», 2008, 172 p. (In Russ.)]
8. Матвеев В.А., Веляев Ю.О., Майоров Д.В. Усовершенствование метода выделения чистого диоксида кремния из растворов от серно-кислотного разложения нефелина. *Химическая технология*, 2013, т. 14, № 8, с. 453-459. [Matveev V.A., Velyaev Y.O., Majorov D.V. Improvement of the method of separation of pure silicon dioxide from solutions of sulfuric acid decomposition of nepheline. *Himicheskaya tekhnologiya*, 2013, vol. 14, no. 8, pp. 453-459. (In Russ.)]
9. Захаров В.И., Калинин В.Т., Матвеев В.А., Майоров Д.В. *Химико-технологические основы и разработка новых направлений комплексной переработки и использования щелочных алюмосиликатов*. ч.1. Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 1995, 181 с. [Zaharov V.I., Kalinnikov V.T., Matveev V.A. etc. *Chemical and technological bases and development of new directions of complex processing and use of alkaline aluminosilicates*. part.1. Apatity: publ. KSC RAS, 1995, 181 p. (In Russ.)]
10. Пат. 2179153 РФ. МПК C01B 33/193 (2000.01). Способ получения диоксида кремния / Захаров Д.В., Захаров К.В., Матвеев В.А., Майоров Д.В.; Закрытое акционерное общество "ХОРС". № 2000114577/12; заявл. 07.06.2000; опубл. 10.02.2002. Бюл. № 4. [Pat. 2179153 RU "Method for producing silicon dioxide" Zaharov D.V., Zaharov K.V., Matveev V.A., Majorov D.V. / Zakrytoe akcionernoe obshchestvo "HORS". № 2000114577/12; zayavl. 07.06.2000; opubl. 10.02.2002. Byul. № 4. (In Russ.)]

11. Веляев Ю.О. *Химико-технологическое обоснование и разработка сернокислотной технологии переработки нефелина с получением коагулянтов, калиевых квасцов и кремнезёмных продуктов*. Дисс. ... канд. техн. наук: 05.17.01.- Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И.В. Тананаева, Апатиты, 2012, 140 с. [Velyaev Yu.O. *Chemical and technological basis and development of sulfuric acid technology of nepheline processing to obtain coagulants, potassium alum and silica products*. Dis. ... kand. tekhn. nauk: 05.17.01.- Institut himii i tekhnologii redkih elementov i mineral'nogo syr'ya im. I.V. Tananaeva, Apatity, 2012, 140 p. (In Russ.)]
12. Parks G.A., de Bruyn P.L. The zero point of charge of oxides. *J. Phys. Chem.*, 1962 vol. 66, no. 6, pp. 967-973.
13. Веляев Ю.О., Иванова А.А. Исследование особенностей строения и некоторых кислотно-основных свойств поверхности алюмосиликатных агломератов, полученных на основе гидролиза продуктов сернокислотного разложения нефелина. *Конденсированные среды и межфазные границы*, 2016, т. 18, № 1, с. 38-45. [Velyaev Yu.O., Ivanova A.A. Study of structural features and some acid-base properties of the surface of aluminosilicate agglomerates obtained on the basis of hydrolysis of sulfuric acid decomposition products of nepheline. *Kondensirovannye sredy i mezhfaznye granicy*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 38-45. (In Russ.)]

STUDY OF SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AMORPHOUS SILICON DIOXIDE OBTAINED FROM NEPHELINE AND THE POSSIBILITY OF ITS USE AS AN ENTEROSORBENT

Velyaev Yu.O.¹, Kometiani I.B.², Bulatnikova E.A.²

¹Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: velyaevyo@yandex.ru

²Kursk State University

Radishcheva str., 33, Kursk, 305000, Russia

Abstract. The article presents the results of studies of some physicochemical characteristics of amorphous high-purity silica obtained from nepheline concentrate by sulfuric acid dehydration of silica-containing solution, which in turn was obtained from nepheline after its opening 25-30% H₂SO₄. The data on the surface morphology of the obtained SiO₂ and its chemical purity by electron microprobe analysis (EMPA) are presented. The structural and surface properties of SiO₂ obtained from nepheline were studied. The data on the specific surface area of the resulting silica (376-469 m²/g) in comparison with existing analogues, including those used as the main active drug in drugs - enterosorbents. The distribution of the specific surface charge in nepheline silica was studied in comparison with the sample of the pharmaceutical preparation "Polisorb MP" by the method of Parks. The similarity of the patterns of this distribution for both samples with a point of zero charge at pH = 9.588 is shown, which is due to the similar surface arrangement of silanol groups on the surface of these silicas. The results of the work allow to predict the possibility of using this sample of silicon dioxide obtained from nepheline concentrate as a basis for medical preparations of sorbing action.

Key words: *nepheline, amorphous silica, sorption, intestinal sorbent.*

PECULIARITIES OF CAFFEINE AND CAFFEINE SODIUM BENZOATE AQUEOUS SOLUTION IN PRESENCE OF FULLERENE C₆₀

Golovchenko I.V., Rogova O.V., Zav'yalova O.S., Miroshnichenko E.V., Dovgalenko V.V.

Sevastopol State University

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

Received: 23.09.2019

Abstract. Aromatic ligands behavior (caffeine and caffeine sodium benzoate) was analyzed in pure aquatic solution and in presence of fullerene C₆₀. To investigate the influence of fullerene C₆₀ conductometric titration curves were obtained. Presence of interaction was confirmed by difference of conductivities of C₆₀/ligand mixture and total conductivities of pure C₆₀ and pure ligand solutions at the same concentrations used in mixture. Significant influence was noticeable with the caffeine salt. The complexation caused noticeable reduction of ligand dissociation and as a result lowering the conductivity of solution. The results of this work can find application in improving the ways of drug delivery by means of their longer preservation in their native form.

Key words: *caffeine, caffeine sodium benzoate, C₆₀ fullerene, molecular aggregation, aquatic solutions.*

INTRODUCTION

One of the most common methods of treatment is the combinative drugs therapy, manifested in reduction of drugs negative effects or varying its physicochemical properties: solubility, affinity, etc. In this regard, it is extremely important to identify the nature of the mechanisms of drugs complex behavior

Despite the large amount of information, there are still disputes over the nature of fullerene and ligands complexation in aquatic solution [1-3].

The aim of the research was to perform the evidence of fullerene C₆₀ impact on the properties aromatic molecules (by example of caffeine and caffeine sodium benzoate).

Caffeine sodium benzoate was chosen as the target of the study because small conductivity values of pure caffeine aquatic solutions.

EXPERIMENTAL PART

Fullerene C₆₀ was produced by Kratschmer's technique [4]. The water solution of fullerene C₆₀ was obtained firstly by means of dissolving fullerene in toluene. Second stage was dissolving toluene with the fullerene in water followed by evaporation of the extract in a rotary vacuum evaporator under reduced pressure. [5] Concentration of fullerene C₆₀ was 0.1 mmol.

Conductometric measurements of all the solutions were performed at 23 °C with conductivity portable meter ProfiLine Cond 3110 with a TetraCon cell:

- conductivity range 0.0...1000 mS/cm ± 0.5 % of measured value;
- salinity range 0.0...70.0 (as per IOT).

The purity of all the compounds was verified with fourier transform infrared spectrometer FT-801, Simex, equipped with "cat's eye" optical scheme based on ZnSe beamsplitter. Spectral range 470-5700 cm⁻¹. All IR spectra were obtained via resolution 4 cm⁻¹, 10 scans per specter, using disturbed total internal reflection (DTIR) module with a ZnSe flange. Spectra processing was handled in ZAIR 3.5 software package.

RESULTS AND DISCUSSION

In the framework of conductometric titration the electrical conductivity σ was measured at various concentrations for aqueous solutions of compounds. The results are shown in Table 1.

Table 1. Values of conductivity (σ) and specific conductivity (σ_{sp}) based on concentration (C) of caffeine and caffeine sodium benzoate at 23 °C in aquatic environment

Caffeine			Caffeine sodium benzoate		
C, mmol	σ , mS/cm	σ_{sp} , mS/(cm*mmol)	C, mmol	σ , mS/cm	σ_{sp} , mS/(cm*mmol)
0,16	3	18,7	0,1	38,4	384
0,2	3,3	16,5	0,2	41,7	208,5
0,3	3,6	12	0,3	52	173,3
0,4	3,6	9	0,4	58,5	146,2
0,5	3,6	7,2	0,5	66,7	133,4
0,6	3,5	5,8	0,6	70,3	117,1
0,7	3,5	5	0,7	88,2	126
0,85	3,4	4	0,84	95	113
0,9	2,9	3,2	0,9	106,6	118,4
1,27	2,8	2,2	1	120	120
1,5	2,5	1,6	1,3	147	113
1,7	2,6	1,5	2	221	110,5
4	2,7	0,6	2,6	288	110,7
6	2,9	0,5	4	425	106,2
8	3,2	0,4	6	631	105,2
10	3,2	0,3	8	841	105,1
12	3,2	0,26	10	1042	103,7
14	3,3	0,23	12	1245	104
16	3,3	0,2	14	1457	102,2
18	3,6	0,2	16	1635	101,3
20	3,9	0,1	18	1824	101,1
-	-	-	20	1998	99,9

While increasing the general conductivity with the ligand concentration rising in both solution (caffeine and caffeine sodium benzoate) the specific (σ_{sp}) conductivity was reducing (fig. 1).

$$\sigma_{sp} = \frac{\sigma}{C} \quad (1)$$

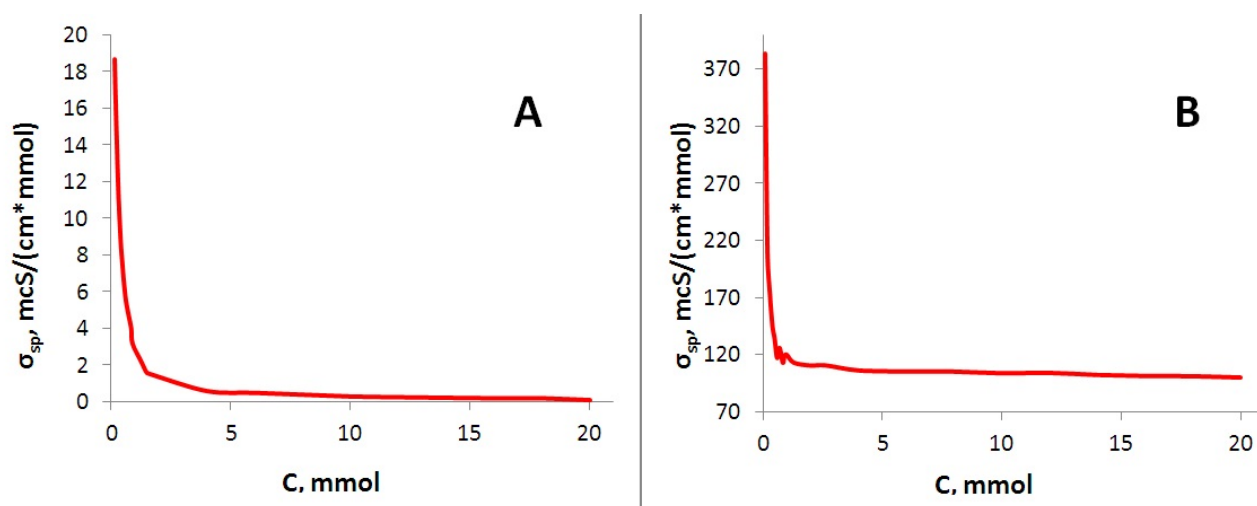
**Figure 1.** Dependences of specific conductivities of caffeine (A) and caffeine sodium benzoate (B) aquatic solutions on concentration of the compounds

Table 2. Values of conductivity (σ) based on concentration (C) of pure caffeine at 23 °C and in mixture with fullerene C₆₀ in aquatic environment

C ₆₀		Caffeine		Caffeine + C ₆₀	
C, mmol	σ , mS/cm	C, mmol	σ , mS/cm	C, mmol	σ , mS/cm
0,01	2,9	0,16	3	0,16	4,2
		0,4	3,6	0,4	4,5
		0,7	3,5	0,7	4,9

Table 3. Values of conductivity (σ) based on concentration (C) of pure caffeine sodium benzoate at 23 °C and in mixture with fullerene C₆₀ in aquatic environment

C ₆₀		Caffeine sodium benzoate		Caffeine sodium benzoate + C ₆₀	
C, mmol	σ , mS/cm	C, mmol	σ , mS/cm	C, mmol	σ , mS/cm
0,01	2,9	0,1	38,4	0,1	38,1
		0,4	58,5	0,4	48,3
		0,7	88,2	0,7	85,4

Such not linear dependences of conductivity on concentration point the selfassociation processes presence.

The next step was to measure the conductivities of pure fullerene C₆₀ solution and of the mixtures of fullerene with each drug avoiding ligands concentration changes (tables 2, 3).

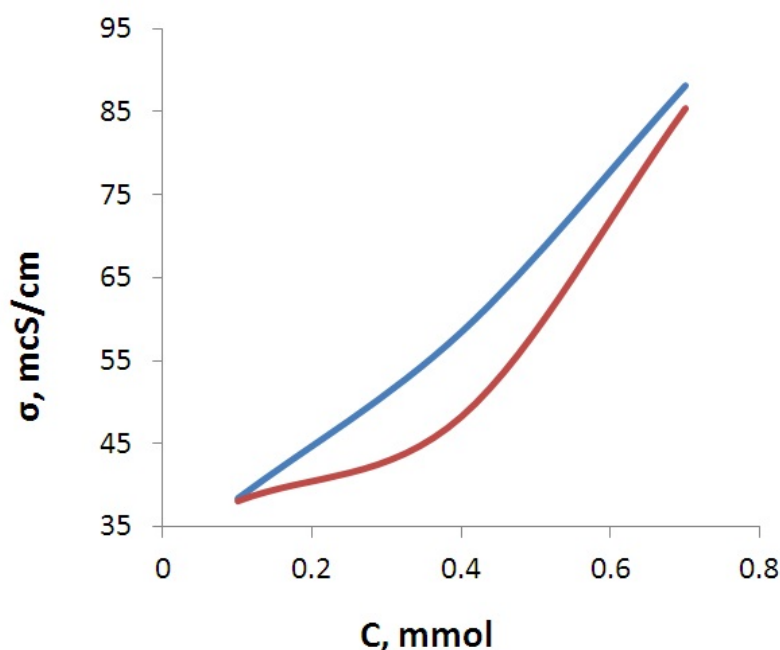
Based on the dependencies (fig. 2), we can conclude that the conductivity of the solution containing fullerene C₆₀ mixture with each of the ligands is less than the total conductivity of pure solutions of fullerene and ligands at the same concentrations as in the mixture:

$$\sigma_{mix} < \sigma_{C_{60}} + \sigma_l, \quad (2)$$

where σ_{mix} – conductivity of fullerene C₆₀ and ligand solution; $\sigma_{C_{60}}$ – conductivity of fullerene C₆₀ solution; σ_l – conductivity of pure ligand solution.

In case of caffeine sodium benzoate the conductivity of mixture was even less than the conductivity of pure ligand solution. This fact clearly demonstrates stabilizing effect of fullerene C₆₀ on caffeine salts. It results in decreasing dissociation constant and consequently conductivity.

Caffeine does not dissociate into ions and the values of conductivity for it turned out to be relatively small. Based on this, it was concluded that the change in conductivity are caused by the interaction of caffeine with a solvent. Therefore the presence of fullerene C₆₀ effects in lowering of caffeine SASA (solvent accessible surface area) resulting in lowering of conductivity in general.

**Figure 2.** Dependences of conductivity of pure caffeine sodium benzoate aquatic solution (blue) and its mixture with the fullerene C₆₀ (red) on concentration of the compounds

CONCLUSION

The evidence of heteroassociation between the compounds can be testified based on the comparison of the conductivity values of pure aromatic ligands solution and its mixture with the fullerene C₆₀. Insignificant concentration of fullerene C₆₀ causes perceptible changes in behavior of aromatic ligands prone to dissociate into ions (caffeine sodium benzoate). These features could be applied in improvement of drugs delivery methods, by means of keeping their native structure for longer period excluding the use of shells and capsules. Preservation of active components in such way may result in dose reduction and side effects decrease.

References:

1. Evstigneev M.P., Lantushenko A.O., Golovchenko I.V. Hidden entropic contribution in the thermodynamics of molecular complexation. *PCCP: Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, vol. 18, no. 11, pp. 7617-7625.
2. Evstigneev V.P., Pashkova I.S., Kostjukov V.V., Evstigneev M.P., Hernandez Santiago, A.A. Optimal experiment design: link between the concentration and the accuracy of estimation of aggregation parameters. *Chemical Physics Letters*, 2016, vol. 664, pp. 133-137.
3. Borowik A., Prylutsky Y., Kawelski Ł., Kyzyma O., Bulavin L., Ivankov O., Cherepanov V., Wyrzykowski D., Kaźmierkiewicz R., Gołuński G., Woźniwodzka A., Evstigneev M., Ritter U., Piosik J. Does C₆₀ fullerene act as a transporter of small aromatic molecules? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, vol. 164, pp. 134-143.
4. Kratschmer, W., Lamp, L.D., Fotiropoulos, K., Huffman, D.R. Solid C₆₀ – a new form of carbon. *Nature*, 1990, vol. 347, no. 9, pp. 354-358.
5. Serdyuk I.E., Belochkina I.V., Kryshchal A.P., Roshal A.D., Nekludov I.M., Borts B.V., Voevodin V.N., Tkachenko V.I., Sandomirskyy B.P. Preparation and biological activity of aqueous colloid solutions of C₆₀ and C₇₀ fullerene mixtures. *Biotechnologia Acta*, 2011, vol. 4, no. 5, pp. 64-70.

БИОСОВМЕСТИМЫЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ХЛОРИНА e_6 : ПОЛУЧЕНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Клименко И.В.¹, Лобанов А.В.^{1,2}

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

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: avlobanov@mail.ru

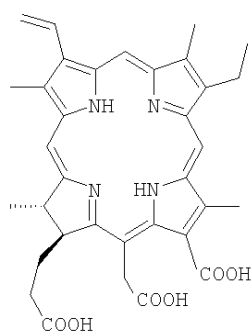
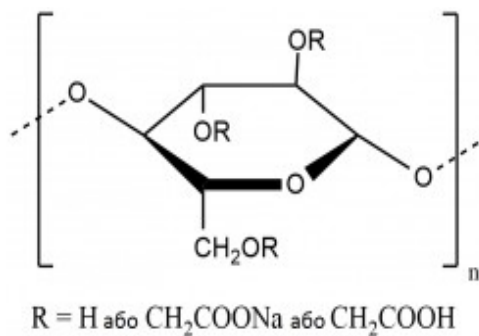
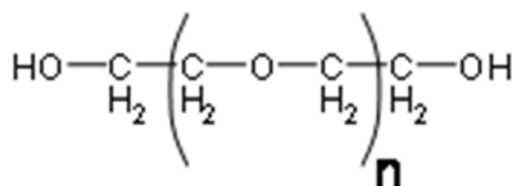
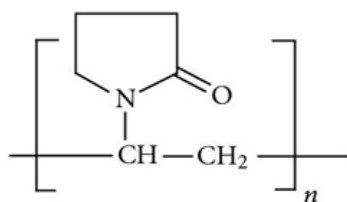
Поступила в редакцию: 30.09.2019

Аннотация. В работе описаны методы синтеза, а также представлены данные изучения спектрально-флуоресцентных свойств новых супрамолекулярных систем на основе хлорина e_6 (He_6) с различными биосовместимыми вспомогательными веществами, такими, как поливиниловый спирт гидролизированный, поли-N-винилпирролидон, *натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы*, диметилсульфоксид, кремфор® PEG-40. Выбор данных вспомогательных соединений объясняется их широким использованием в качестве биологически совместимых веществ, применяемых как часть фармакологических препаратов. Отмечена высокая эффективность применения таких систем, как кремфор® PEG-40 – He_6 и поли-N-винилпирролидон – He_6 для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Установлено, что спектрально-флуоресцентные характеристики данных систем свидетельствуют о дезагрегации молекул He_6 , последовательном взаимодействии их со вспомогательными веществами в растворах и образовании молекулярных ассоциатов и молекулярных комплексов типа пигмент-пигмент и пигмент-солубилизатор. Полученные результаты доказывают перспективность создания метода управляемой агрегации фотосенсибилизаторов (ФС) в составе супрамолекулярных комплексов, его использования при разработке лекарственных препаратов для фотодинамической терапии с прогнозированной фотодинамической активностью и тестирования *in vivo* эффективных ФС.

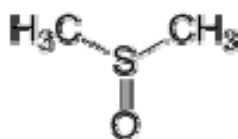
Ключевые слова: хлорин e_6 , супрамолекулярные системы, спектральные характеристики, оптическое поглощение, флуоресценция.

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) клинически используется в качестве метода нехирургического лечения при онкологических, офтальмологических и других заболеваниях и основан на генерации синглетного кислорода в результате фотохимических реакций, происходящих в патологических участках под действием энергии видимого диапазона. Избирательное уничтожение клеток опухоли достигается в результате реакции, происходящей при длине волны облучаемого света, соответствующей максимальной восприимчивости фотосенсибилизатора (ФС). К числу перспективных ФС относится хлорин e_6 (водорастворимое производное хлорофилла) [1], обладающий избирательной способностью накапливаться в опухоли и активирующий систему клеточного иммунитета, в том числе, клетки-киллеры, распознающие и уничтожающие раковые клетки. Хлорин e_6 (He_6) имеет следующие спектральные и энергетические характеристики: максимум поглощения находится в области 660 ± 5 нм, что соответствует области наибольшей оптической прозрачности для биологических тканей, а квантовый выход синглетного кислорода достигает 0,7 [2, 3]. Большую роль в разработке соединений на основе хлорина играет доступность сырья, так как предшественник хлоринов хлорофилл *a* производится, например, из микроводоросли *Spirulina platensis* или листьев крапивы [1, 4, 5]. Хлорин e_6 (He_6) образуется при анаэробном щелочном гидролизе феофорбида *a*, полученного, в свою очередь, при обработке хлорофилла *a* концентрированными кислотами [6]. Хлорофилл, как элемент обычных питательных сред, не является ядом для человека. Энергетический потенциал He_6 , как производного хлорофилла, идентичен здоровым клеткам организма, и избирательное накопление его в опухолевых тканях происходит из-за захвата его в качестве «питательной среды» для них.

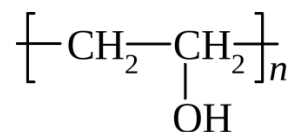
Принципиально важным при разработке препаратов для ФДТ является отсутствие агрегации ФС в растворах, которая, в свою очередь, приводит к падению квантового выхода генерации синглетного кислорода. Известно, однако, что молекулы He_6 образуют агрегаты в водных растворах, что значительно снижает его фотодинамическую активность. С целью оптимизации фотофизических и фармакологических свойств, а также создания новых лекарственных средств, применяемых при ФДТ, в данной работе получены новые супрамолекулярные системы на основе He_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ М). В качестве вспомогательных веществ в этой работе были использованы поливиниловый спирт гидролизированный (ПВС, $[-CH_2CH(OH)-]_n$, Aldrich, 130 кДа, 0,1% раствор), поли-N-винилпирролидон (ПВП, Sigma, 10 кДа, 1% раствор), *натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы* (Na-КМЦ, пищевая добавка Е466, $[C_6H_7O_2(OH)_x(CH_2COONa)_y]_n$, Acros, 250 кДа, 0,1% раствор), диметилсульфоксид (ДМСО, $M = 78,13$ г/моль, $\rho = 1,1004$ г/см³, 1% раствор), кремфор® PEG-40 (ПЭГ, солубилизатор гидрогенизированного касторового масла, полиэтиленгликоль ПЭГ-40, 0,1% раствор). Все они являются биологически совместимыми веществами, применяемыми как часть фармакологических препаратов. Хлорин e_6 был любезно предоставлен сотрудниками кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет». Структурные формулы используемых в работе веществ приведены на рисунке 1.

... Хлорин e_6 *Na-KMЦ*ПЭГ, $n=40$ 

ПВП



ДМСО



ПВС

Рисунок 1. Структурные формулы используемых в работе веществ

Спектры оптического поглощения (200-900 нм) регистрировали с помощью UV-VIS спектрофотометра TU-1901 фирмы "Beijing Purkinje General Instrument Co, Ltd". Анализ плохо разрешенных спектров поглощения проводили на основе разложения его на гауссовы составляющие. Регистрация спектров флуоресценции в области 550-800 нм проводили с использованием спектрофлуориметра «Флюорат-02 Панорама» фирмы «Люмэкс». Длина волны возбуждения составляла 410 нм. Все измерения проводили при 20°C.

На рисунке 2 представлены спектры оптического поглощения исследуемых супрамолекулярных систем на основе He_6 в различных вспомогательных веществах. Для сравнения показан спектр оптического поглощения He_6 . Спектр поглощения хлорина e_6 содержит характерную полосу Соре (В-полосу) в области ~404 нм, три малоинтенсивных пика в области 500-600 нм и, благодаря частично гидратированным порфириновым кольцам, ярко выраженный пик при $\lambda=653$ нм, соответствующий максимуму Q-полосы. Анализ спектров в области пика Соре свидетельствует об одинаковой гидрофобности всех представленных систем. Кроме того, гипохромные изменения спектра в области полосы Соре, скорее всего, можно объяснить появлением в растворе комплексов **ПВП- He_6** , **ДМСО- He_6** , **ПЭГ- He_6** и **Na-KMЦ - He_6** . Вероятно, в них хромофор находится в более упорядоченной форме по сравнению со своим свободным состоянием в водном растворе He_6 . Смещение спектра оптического поглощения He_6 в длинноволновую область при использовании всех представленных в данной работе вспомогательных веществ является хорошей предпосылкой повышения проницаемости тканей для видимого света и снижения поглощения света гемоглобином крови в области 500-600 нм, что играет существенную роль для увеличения эффективности ФДТ.

В области Q-полосы представленных оптических спектров поглощения всех биосовместимых систем наблюдается батохромный сдвиг максимума поглощения, при этом максимальный сдвиг в область длинных волн наблюдается у систем **ПВП- He_6** и **ПЭГ- He_6** на 12 и 13 нм, соответственно. Данные изменения спектра поглощения в присутствии вспомогательных веществ, вероятно, связаны с сольватохромным эффектом, вызванным присутствием менее полярного, в отличие от только водного раствора, окружения хлорина e_6 . Нельзя

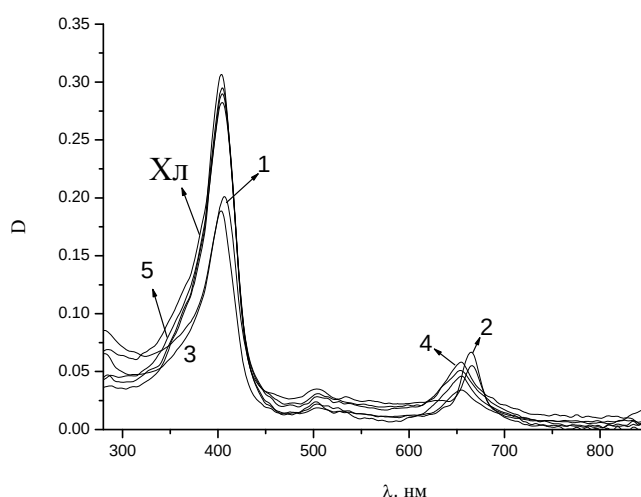


Рисунок 2. Спектры оптического поглощения супрамолекулярных систем на основе Xe_6 (2×10^{-5} М) в различных вспомогательных веществах: 1. Хл – водный раствор Xe_6 , 2. ПЭГ-40 - Xe_6 , 3. ПВП - Xe_6 , 4. *Na-КМЦ* - Xe_6 , 5. ПВС - Xe_6 , 5. ДМСО - Xe_6

также отрицать и мономеризацию агрегированных молекул Xe_6 в присутствии вспомогательных веществ. Взаимодействии Xe_6 со вспомогательными веществами в растворах и образовании молекулярного комплекса. Подтверждением этому является появление в области ~600-640 нм спектров всех супрамолекулярных систем линий комплекса молекул порфирина с вспомогательными веществами.

Анализ спектрально-люминесцентных свойств представленных в данной работе систем показал (рис. 3), что добавление всех вспомогательных веществ приводит к увеличению интенсивности люминесценции Xe_6 . Максимальное увеличение интенсивности люминесценции характерно для систем ПЭГ- Xe_6 , ПВП - Xe_6 , *Na-КМЦ* - Xe_6 и ПВС - Xe_6 . Следует отметить, что наблюдаемый сильный батохромный сдвиг максимума люминесценции, особенно в присутствии таких биосовместимых вспомогательных веществ, как *кремофор®* PEG-40 и ПВП, также свидетельствует о появлении комплекса “вспомогательное вещество - Xe_6 ”.

На основании всех представленных данных можно с уверенностью утверждать, что применение таких биосовместимых супрамолекулярных систем, как *кремофор®* PEG-40 - Xe_6 и ПВП - Xe_6 для ФДТ и диагностики является очевидным. При этом солюбилизация во всех растворах представленных вспомогательных веществ препятствует агрегации хлорина e_6 , обеспечивает его эффективную стабилизацию либо в мономерной флуоресцентно-активной форме, либо в виде комплекса с переносом заряда. Полученные результаты также свидетельствуют о перспективности создания метода управляемой агрегации ФС в составе супрамолекулярных комплексов и его использования при разработке лекарственных препаратов для фотодинамической терапии с

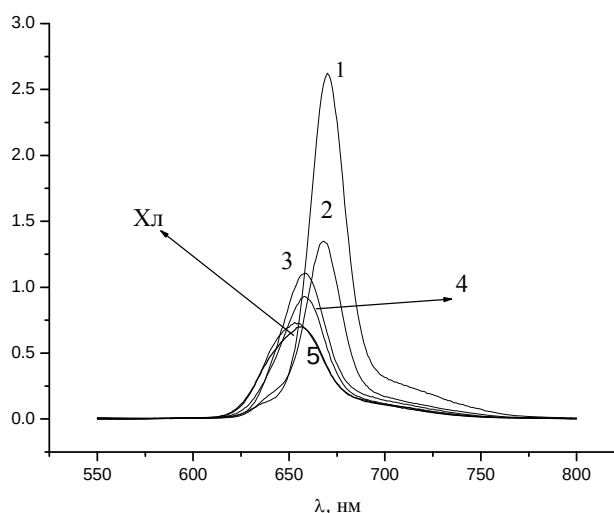


Рисунок 3. Спектры флуоресценции супрамолекулярных систем на основе Xe_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в различных вспомогательных веществах: 1. Хл – водный раствор Xe_6 , 2. ПЭГ-40 - Xe_6 , 3. ПВП - Xe_6 , 4. *Na-КМЦ* - Xe_6 , 5. ПВС - Xe_6 , 5. ДМСО - Xe_6

прогнозированной фотодинамической активностью. Кроме того, простота синтеза лекарственных препаратов и простота выполнения процедуры ФДТ делает возможным проведение тестирования *in vivo* эффективных ФС.

Список литературы / References:

1. Клименко И.В., Лобанов А.В. Спектрально-флуоресцентные свойства супрамолекулярных систем на основе хлорина e_6 . *Химическая физика*, 2018, т. 37, № 1, с. 13-20. DOI: 10.7868/S0207401X18010077. [Klimenko I.V., Lobanov A.V. Spectral-fluorescent properties of supramolecular systems based on E6 chloride. *Himicheskaya fizika*, 2018, vol. 37, no. 1, pp. 13-20. DOI: 10.7868/S0207401X18010077. (In Russ.)]
2. Zenkevich E., Sagun E., Knyukshto V., Shulga A., Mironov A. et al. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT. *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1996, vol. 33, no 2, pp. 171-180.
3. Пархоц М.В., Галиевский В.А., Сташевский А.С., Трухачева Т.В., Джагаров Б.М. Динамика и эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода хлорином e_6 : влияние pH раствора и поливинилпирролидона. *Оптика и спектроскопия*, 2009, т. 107, № 6, с. 1026-1032. [Parkhots M.V., Galievsky V.A., Stashevsky A.S., Trukhacheva T.V., Jagarov B.M. Dynamics and efficiency of photosensitized formation of singlet oxygen by e_6 chloride: effect of pH solution and polyvinylpyrrolidone. *Optika i spektroskopiya*, 2009, vol. 107, no. 6, pp. 1026-1032. (In Russ.)]
4. Klimenko I.V., Lobanov A.V. Photosensitizing properties of supramolecular systems based on chlorin e_6 . *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, 2016, vol. 2, no. 4, p. 040310-1-5. DOI: 10.18287/JBPE16.02.040310.
5. Клименко И.В., Лобанов А.В. Спектрально-флуоресцентные свойства хлорина e_6 в различных супрамолекулярных системах. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, № 1-2, с. 71-75. [Klimenko I.V., Lobanov A.V. Spectral-fluorescent properties of E6 chloride in various supramolecular systems. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, vol. 1-2, pp. 71-75. (In Russ.)]
6. Шляхтин С.В., Трухачева Т.В. Возможности и перспективы использования производных хлорофилла для создания эффективных и безопасных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Обзор литературы. *Вестник фармации*, 2010, № 2 (48), с. 87-106. [Shlyakhtin S.V., Trukhacheva T.V. Possibilities and prospects of using chlorophyll derivatives to create effective and safe photosensitizers for photodynamic therapy. Literature review. *Vestnik farmacii*, 2010, No. 2 (48), pp. 87-106. (In Russ.)]

BIOCOMPATIBLE SUPRAMOLECULAR SYSTEMS BASED ON CHLORIN e_6 : PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

Klimenko I.V.¹, Lobanov A.V.^{1,2}

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences,
Kosygin str, 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

² N.N. Semenov Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences,
Kosygin str, 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: avlobanov@mail.ru

Abstract. The paper presents the methods of synthesis, as well as data of spectral-fluorescent study for new supramolecular systems based on chlorin e_6 (Ce_6) with various biocompatible excipients, such as hydrolyzed polyvinyl alcohol, poly-N-vinylpyrrolidone, sodium salt of carboxymethyl cellulose, dimethylsulfoxide, Cremophor® PEG-40. The choice of these excipients is due to their high use as biocompatible materials treated as a part of pharmacological drugs. High efficiency of such systems as cremophore® PEG-40- Ce_6 and poly-N-vinylpyrrolidone- Ce_6 for fluorescent diagnostics and photodynamic therapy is shown. Spectral-fluorescent characteristics of these systems have been found to indicate the disaggregation of Ce_6 molecules, their sequential interaction with excipients in solutions and a formation of molecular associates and molecular complexes of pigment-pigment and pigment-solubilizer types. The obtained results can be useful for creation a method of controlled aggregation of photosensitizers (PS) as a part of supramolecular complexes, its application in the development of medicines with predicted photodynamic activity for photodynamic therapy and diagnostics and testing in vivo effective PS.

Key words: chlorin e_6 , supramolecular systems, spectral characteristics, optical absorption, fluorescence.

МАГНИТНЫЙ ВЕКТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КАК МОДУЛЯТОР ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ.

Апельцин В.Ф.¹, Полетаев А.И.^{2,3}, Трухан Э.М.²

¹ МГТУ им. Н.Э. Баумана

Москва, 105005, РФ

² Московский физико-технический институт (университет)

Институтский пер., 9, г. Долгопрудный, 141700, РФ

³ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: ap0068@mail.ru

Поступила в редакцию: 10.10.2019

Аннотация. Приведен обзор исследований по влиянию векторного потенциала (ВП) на ряд биологических и физиологических процессов. Показано, что дополнительный стационарный векторный потенциал, создаваемый специальным сконструированным устройством, вызывает изменение свойств очищенной воды и вызывает ряд биологических эффектов у разных объектов разных групп. Приведены примеры влияния модулированного ВП (векторного потенциала) на ряд физиологических показателей организма человека. Приведенные примеры свидетельствуют о том, что действие ВП – это важный фактор, модулирующий множество химических и биологических процессов.

Ключевые слова: векторный потенциал, биологическая активность слабых полей, структура воды, электрофизиологическая стимуляция.

Влияние электромагнитных факторов на биологические системы и, в частности, на организм человека представляет собой классический предмет таких дисциплин, как биофизика, физиология и других направлений теоретических и прикладных медико-биологических исследований. Количество отечественных и зарубежных научных публикаций на эту тему исчисляется многими тысячами.

Многие годы ведутся исследования влияния на биологические объекты электромагнитных факторов в различных частотных диапазонах – от постоянных полей до гамма-излучения. Отдельное направление исследований – воздействия маломощного излучения лазеров видимого и ближнего ИК-диапазонов, слабых СВЧ- и КВЧ-излучений, малых и сверхмалых магнитных полей. К этому перечню полевых воздействий относится также безроторный (т.е. лишенный магнитного поля) статический векторный потенциал [1].

Векторный потенциал, $\mathbf{A}$, впервые появился в физике в середине 19 века усилиями ряда учёных: В. Вебера, Ф. Неймана, У. Томсона, Г. Кантора, Д. Максвелла, как качественная, а затем и количественная характеристика деформационного «электротонического напряжения эфира», ответственного за взаимодействие токов [1]. В современной электродинамике за векторным потенциалом $\mathbf{A}$ укрепились представление как о вспомогательной математической величине, облегчающей вычисление параметров магнитного и электрического полей (а именно, индукции магнитного поля: $\mathbf{B} = \text{rot} \mathbf{A}$, и напряжённости электрического поля: $\mathbf{E} = \text{grad} \phi - \partial \mathbf{A} / \partial t$, не претендующей на самостоятельный физический смысл. Однако, после идеи, высказанной и опубликованной в 1959 г. Аароновым и Бомом [2], стало возможным рассматривать векторный потенциал как поле, имеющее самостоятельное физическое значение. Векторный потенциал способен оказывать непосредственное воздействие на волновые функции электронов. в том числе и тогда, когда в месте расположения объекта воздействия $\text{rot} \mathbf{A} = 0$, т.е. магнитного поля нет. Эти соображения были встречены с определенным недоверием, но с годами (то есть примерно за 25 лет) реальность эффекта была перепроверена в лабораториях разных стран и получила экспериментальное подтверждение («эффект Ааронова-Бома»). Представление о прямом действии векторного потенциала на волновые функции частиц получило развитие в ряде работ других авторов. В 1989 году была опубликована популярная статья [3], в которой указывалось на потенциальную значимость векторного потенциала в физике вообще и для развития микроэлектроники, в частности.

Далее мы хотим обратить внимание на ряд биологических и химических проявлений как постоянного *дополнительного* векторного потенциала (ВП) – дополнительного к естественному, - создаваемого специальным устройством, а также на ряд физиологических эффектов, которые вызываются *модулированным* векторным потенциалом (МВП).

Стационарный векторный потенциал и его проявления в биологических объектах.

В контексте рассматриваемой проблемы нас интересует в первую очередь случай создания безроторного векторного потенциала, т.е. потенциала, свободного от магнитного поля в области расположения объекта воздействия. Геометрия устройства, создающего локализованное магнитное поле, хорошо известна, это соленоид, свернутый в тор, или намагниченный стержень, замкнутый в «бублик» (рис. 1). Магнитное поле сосредоточено внутри тела «бублика», снаружи же от него лишь *безроторный* векторный потенциал. Линии векторного потенциала охватывают соленоид или магнитный стержень, создавая в центре кольца и вблизи от него область относительно однородного поля. Величину потенциала в функции координат можно найти, если воспользоваться подобием выражения $\mathbf{A}$ через $\mathbf{B}$ и выражения $\mathbf{B}$ через $\mathbf{j}$ ($\mathbf{j}$ – ток в объекте) [4].

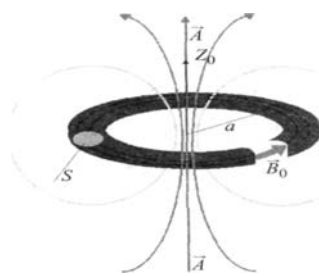


Рисунок 1. Схема создания безроторного векторного потенциала. Линии вокруг тора – направление векторного потенциала.

Так, на оси тонкого кольца с магнитной индукцией B для векторного потенциала получим [4]:

$$A = \Phi r^2 [2(r^2 + z^2)]^{-3/2}, \quad \Phi = BS.$$

Здесь r – радиус тора; z – расстояние от плоскости кольца; S – площадь поперечного сечения тела тора. При $r = 3$ см, $S = 2$ см², $B = 150$ мТл, $z = 0$ (в центре плоскости кольца) $A = 3,56 \cdot 10^{-4}$ Тл·м. При удалении от центра по оси на расстояние $z = 5$ см $A = 4,9 \cdot 10^{-5}$ Тл·м, т.е. такое устройство обеспечивает необходимую величину векторного потенциала. При этом во всем пространстве, окружающем тор, магнитное поле, создаваемое устройством, *отсутствует* [4]. Для того, чтобы гарантировать чистоту условий эксперимента в экспериментальной работе [3] «бублик», создающий векторный потенциал A , дополнительно помещали в магнитный экран, который блокировал рассеянное магнитное поле в окружающем пространстве. Напряженность рассеянного поля не превышала величины магнитного поля Земли ~ 50 мкТл. В нашей отдельной работе было показано, что для векторного потенциала A проводящий экран не является препятствием [5].

В качестве лабораторного источника векторного потенциала (ВП) использовали специальное устройство, описанное ранее в работах [1, 6, 7]. Устройство состоит из особым образом расположенных в замкнутом магнитопроводе вставками самарий-кобальтовых магнитов. Устройство создает замкнутый локализованный поток магнитной индукции, вне которого имеется область «безроторного» векторного потенциала. Теоретически и практически эта область не создает дополнительного магнитного поля. Расчетная максимальная величина векторного потенциала, создаваемого в этой области, отлична от нуля и составляет $3,5 \cdot 10^{-4}$ Тл·м.

При обработке воды дополнительным статическим векторным потенциалом (дополнительным к ВП, связанному с различными факторами окружающей среды) были получены следующие результаты.

1. Показано увеличение подвижности одноклеточного гидробионта, простейших (одноклеточных спиростом) *Spirostomum ambiguum*, культивируемых в лабораторных условиях [1].
2. Показано достоверное предпочтение мышей к употреблению обработанной ВП воды [1].
3. Отмечено увеличение интенсивности выделения газа при сбраживании сахарозы в суспензии дрожжей [1].
4. Отмечено изменение спектров поглощения обработанной ВП высокочистой воды – в дальней УФ-области (200-230 нм) [8].
5. Регистрировалось изменение скорости окисления гидрохинона в водном растворе.
6. Дополнительный ВП влиял также на процесс олигомеризации кремнезема [9].
7. При исследовании (моноцитарно-макрофагальной) активности МОНОЦИТОВ И МАКРОФАГОВ (клеток) мышей было показано [7], что воздействие ВП на них в течение 30 мин вызывает ряд изменений, регистрируемых в периферической крови мышей. Эти изменения касаются роста числа лейкоцитов (в 1,2-1,4 раза), изменения соотношения лимфоцитов и нейтрофилов, увеличения (в полтора раза) адгезии макрофагов, увеличения продукции активных форм кислорода макрофагами (до трех-четырёх раз). Изменялись и другие параметры крови. Изменения носили длительный характер, в некоторых случаях максимумы наблюдались на 3-и сутки после воздействия ВП.

Эти результаты свидетельствуют о существенном и длительном влиянии дополнительного ВП на активность некоторых клеточных компонент крови. Эти данные согласуются также с предположением о возможной роли вариаций векторного потенциала в физиологическом действии возмущений магнитосферы Земли на биоту и, в частности, на состояние физиологических систем человека.

Влияние переменного векторного потенциала на некоторые физиологические процессы.

Для проверки эффективности влияния векторного потенциала на физиологический статус организма человека были проведены несколько групп экспериментов на добровольцах с использованием специально разработанного устройства – индуктора *модулированного* векторного потенциала (МВП). Индуктор представлял собой тороидальный магнитопровод с тороидальной намоткой проводом ПЭЛ. Модуляция векторного потенциала осуществлялась за счет пропускания переменного тока от генераторов через обмотку магнитопровода.

Как указывалось выше геометрия устройства, создающего локализованное магнитное поле, хорошо известна, это – соленоид, свёрнутый в тор (рис.1). Устройства для создания МВП создавались с использованием тороидальных ферритовых магнитопроводов.

На ферритовый сердечник ($\mu = 2000$) вручную наматывали 600-650 витков медного провода ПЭЛ 0,12 и заключали устройство в пластиковый или в деревянный футляр. Можно оценить, что для эффекта, сравнимого с влиянием постоянного $|A| \sim 3 \cdot 10^{-5}$ Тл·м необходим ток в обмотке равный $I = 50 \cdot A_{\text{мин}}$, что составляет $I \sim 1,5$ мА. Последующие эксперименты показали, что значимые физиологические эффекты появляются при величинах тока I в обмотке устройства - индуктора МВП, - от 0,5 до 3 мА.

Эксперименты проводили на добровольцах. В качестве задающего генератора использовали либо генераторы стандартных сигналов, либо специализированные генераторы частотных пакетов от приборов биорезонансной терапии («Лидомед»). Для воздействия МВП были исследованы различные участки тела: солнечное сплетение, крестцовый отдел (основание) или поясничный отдел (средний участок) позвоночника, верхняя часть шейного отдела и др.

Для воздействия МВП была выбрана зона верхняя часть шейного отдела у основания черепа. Выбор определялся двумя причинами: во-первых, в этой области расположены важные в функциональном отношении ганглии вегетативной нервной системы, а также проводящие пути нервов, связывающих головной мозг с периферическими отделами вегетативной нервной системой; во-вторых, опытным путем было установлено, что воздействие именно в этом районе тела позволяет достичь воспроизводимых и сильно выраженных эффектов.

Исследования методически одного типа проводились с целью определения действия МВП на относительную активность симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы. Такая оценка в настоящее время легко осуществляется с помощью кардиометрии [10]. Статистический анализ R-R интервалов кардиограммы позволяет определить относительные уровни активности симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы.

Оценка относительной активности симпатической и парасимпатической систем проводили с помощью кардиомонитора «Биоквант» (г. Новосибирск) и соответствующей программы обработки получаемых данных. Ниже представлены экспериментальные данные кардиометрии. Частотная зона LF (low frequency) и её спектральная мощность соответствует активности симпатической нервной системы. Зона 0,15-0,4 Гц – HF (high frequency) – соответствует активности парасимпатической системы. На рисунке 2 приведен статистический спектр частот R-R интервалов (300 кардиоциклам) исходного состояния активности испытуемого.

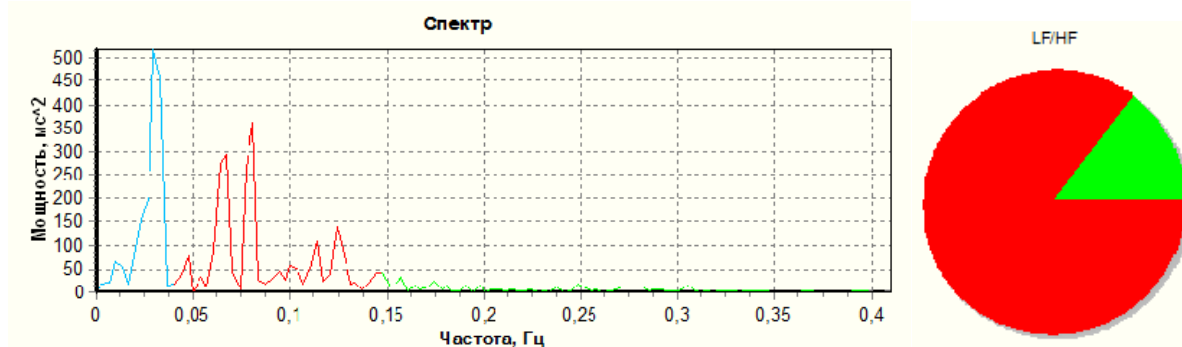


Рисунок 2. Исходное состояние испытуемого, в спектре R-R интервалов доминируют частоты LF (0,4-1,5 Гц > 80%), то есть, преобладает активность *симпатической* нервной системы, что хорошо видно на круговой диаграмме (сектор LF составляет более 80%)

Воздействие на организм ПВП в области основания черепа длительностью 5 мин (частотами 50-70 кГц) вызвало реакцию переключения активности вегетативной нервной системы (из зоны LF в зону HF) от доминирующей активности симпатической системы к преобладанию активности парасимпатической системы. Это переключение регуляции сердечного ритма произошло и всегда происходило с задержкой по времени 12-15 мин (рис. 3).

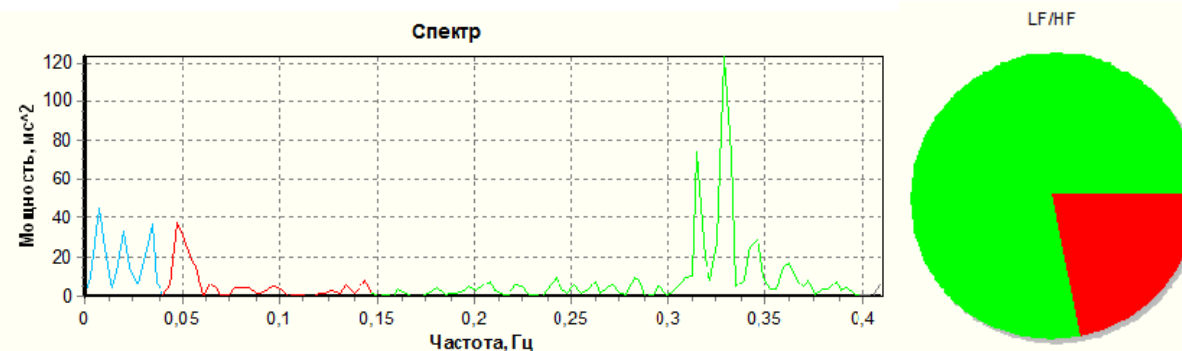


Рисунок 3. Измерения спектра R-R интервалов через 18 минут после 5 мин действия кольцевого индуктора МВП в области основания черепа свидетельствуют о доминирующей активности *парасимпатической* нервной системы (сектор HF более 75%)

Удельная активность парасимпатической системы после использованного воздействия (сектор – HF) составляет более 75% по спектральной мощности. Воздействие МВП данного частотного диапазона вызывает всегда яркую активацию парасимпатической части вегетативной системы.

Низкочастотное воздействие МВП (5 мин) в той же зоне организма (верхняя часть шеи) через 15 минут после предыдущего измерения вызывает обратное повышение активности *симпатической* нервной системы (рис. 4).

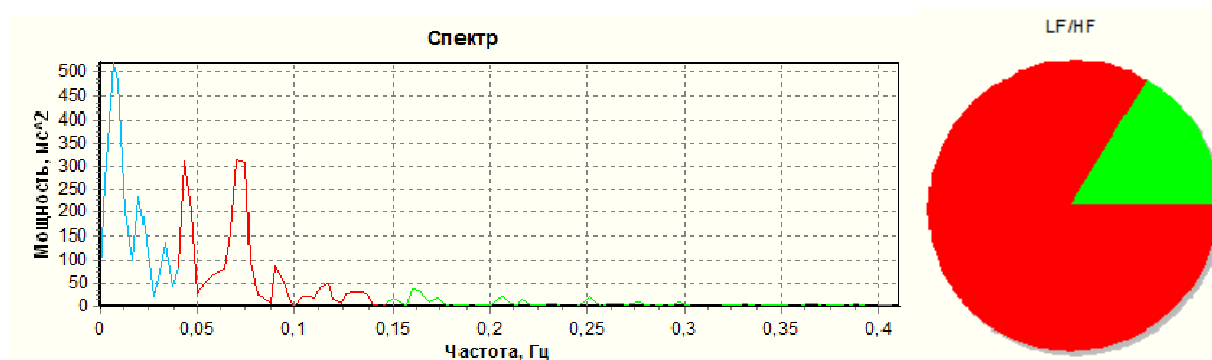


Рисунок 4. Воздействие после предыдущего измерения. Измерения спектра R-R интервалов через 15 минут после 5 мин воздействия низкочастотного МВП в области основания черепа свидетельствуют о переключении доминирующей активности обратно на *симпатический* отдел нервной системы.

Приведенные результаты позволяют заключить, что электрически неконтактное воздействие МВП в области верхней части шеи вызывает специфическую активацию либо симпатического отдела ВНС (рис. 4), либо парасимпатического отдела (Рис.3) в зависимости от использованных частот модуляции ВП. Проявление действия ВП на отделы ВНС имеет отсроченный характер с латентным периодом 15-20 мин.

Изменения адаптационной активности организма под действием МВП.

Также проводилась оценка изменений *адаптационных возможностей* организма путем регистрации спектра низкочастотных сигналов (0,5 -25Гц) с использованием аппарата «Омега-М» («Динамика», С–Петербург: «Dinamika Technologies», www.dyn.ru) и соответствующей программы обработки получаемых данных. Используемая методика была специально разработана в 90-е годы для экспресс оценки работоспособности и адаптационных ресурсов людей, работающих в экстремальных условиях.

В целях нашего исследования использовали главным образом только два из информативных параметров анализатора – спектры сигналов, сопровождающих кардиосигналы и параметр гармонизации сигналов, получаемый через *фрактальный анализ* по специальным математическим алгоритмам.

Спектры сопутствующих сигналов регистрируются прибором в диапазоне частот от 0,5 до 25 Гц, что условно соответствует нескольким диапазона частот ЭЭГ: дельта (0,5-4 Гц), тета (4-8 Гц), альфа (8-13 Гц), бета (13-19 Гц) и гамма (19-25 Гц).

Сравнение двух спектрограмм на рисунке 5 показывает, что примененное воздействие ПВП в области верхней части шеи резко изменило спектральное распределение сигналов. Воздействие привело к сильной активации α -, β - и γ -частот. Такая динамика свидетельствует о стимулирующем эффекте и активации работоспособности.

На рисунке 6 приведены «фрактальные портреты» биоритмов в этих двух состояниях: исходном и после стимуляции МВП. Наблюдается сильный «эффект гармонизации» биоритмов (ГБ), вызванных стимуляцией через действие МВП – от 29% до 60%, что соответствует росту адаптационных ресурсов организма.



Рисунок 5. Пример спектрограммы, полученной у испытуемого в исходном спокойном состоянии (утром в 10:20 мин). Видно, что основная мощность сигналов сосредоточена в области самых низких частот (область 0 - 4 гц – «дельта» - 64%). Справа аналогичная спектрограмма, полученная после низкочастотного воздействия ПВП в области шеи (регистрация через 15 мин после воздействия)

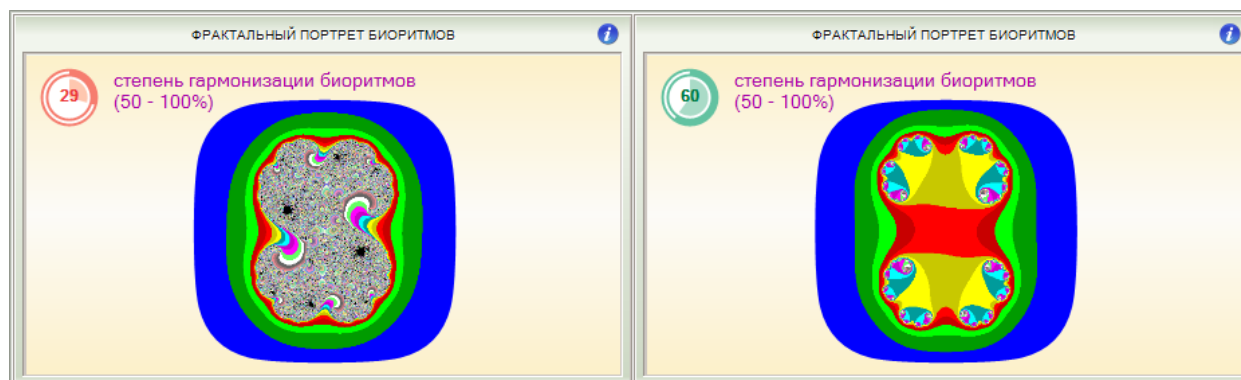


Рисунок 6. Фрактальные портреты биоритмов в исходном состоянии (слева) и после 5 мин низкочастотного воздействия МВП в области шеи

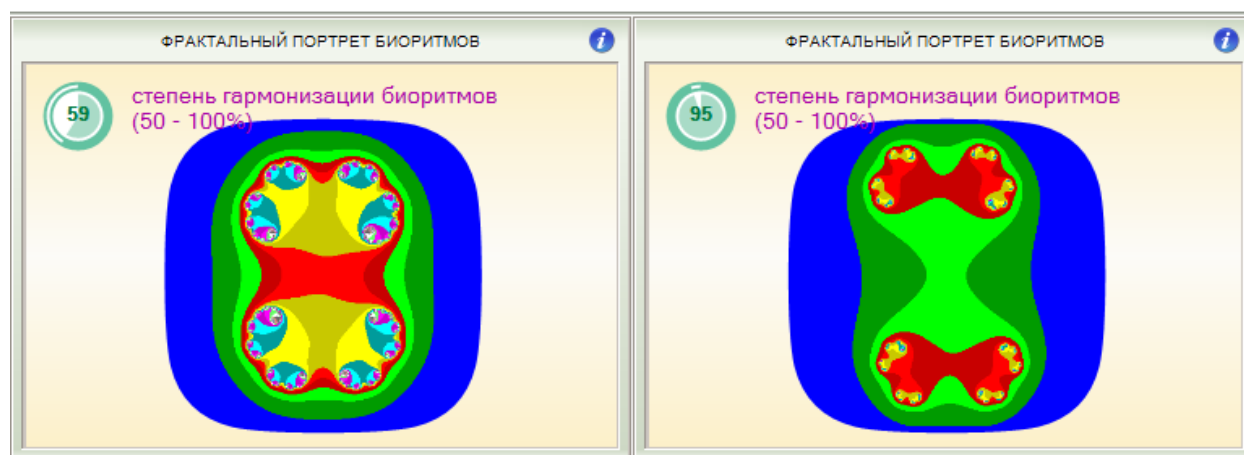


Рисунок 7. Фрактальные портреты биоритмов после 5 мин низкочастотного воздействия МВП в области шеи (слева) и после дополнительных 10 мин воздействия МВП с амплитудой сигнала увеличенной в три раза (справа)

На рисунке 7 показаны «фрактальные портреты» биоритмов до и после дополнительных 10 мин воздействия МВП с амплитудой сигнала увеличенной в три раза. Наблюдается рост параметра ГБ (гармонизации биоритмов) от 59% до 95%. Очевидно, что более длительная стимуляция с большей интенсивностью МВП приводит к более выраженным эффектам.

В соответствии с критериями авторов данной технологии эти результаты свидетельствуют о сильном и выраженном влиянии МВП в выбранных частотных диапазонах как на активность отдельных частей вегетативной нервной системы, так и на повышение адаптационных ресурсов испытуемых. Повышение физиологической работоспособности наступает достаточно быстро и не требует дополнительного воздействия ни фармакологического характера, ни тренинга дыхательно-физкультурного характера.

Оценка влияния МВП на организм человека с помощью сегментарной диагностики.

Ещё одним интегральным приборным методом оценки влияния МВП на физиологические процессы является сегментарная диагностика [11]. Метод предназначен для клинко-физиологической диагностики функционального состояния организма человека на основе измерения переходных электрических характеристик комплексной электропроводности организма человека по рефлексогенным биологическим активным зонам кожи с последующей топической экспресс-оценкой по специальным алгоритмам. Этот метод после нескольких десятилетий развития с 2012 года входит в перечень диагностических методов, утвержденных МЗ РФ.

Приборы сегментарного тестирования автоматически проводят последовательное сканирование соответствующих участков головы и конечностей импульсами отрицательной и положительной полярности, с частотой следования 10 Гц. Воздействующий в процессе диагностики пациента электрический тест-сигнал по амплитуде и частоте является физиологическим для организма и не вызывает у пациента дискомфортных ощущений. Технически сканирование осуществляется путем регистрации токовых сигналов через шесть электродов, расположенных симметрично на теле: два в лобной зоне, два на запястьях рук и два на обнаженных ступнях ног.

Регистрация электрических сигналов в разных частотных диапазонах от различных комбинаций (22 варианта отведения) этих шести электродов позволяет решить обратную задачу - оценку активности отдельных сегментов спинного мозга. Поскольку активность каждого сегмента соответствует функциональному состоянию

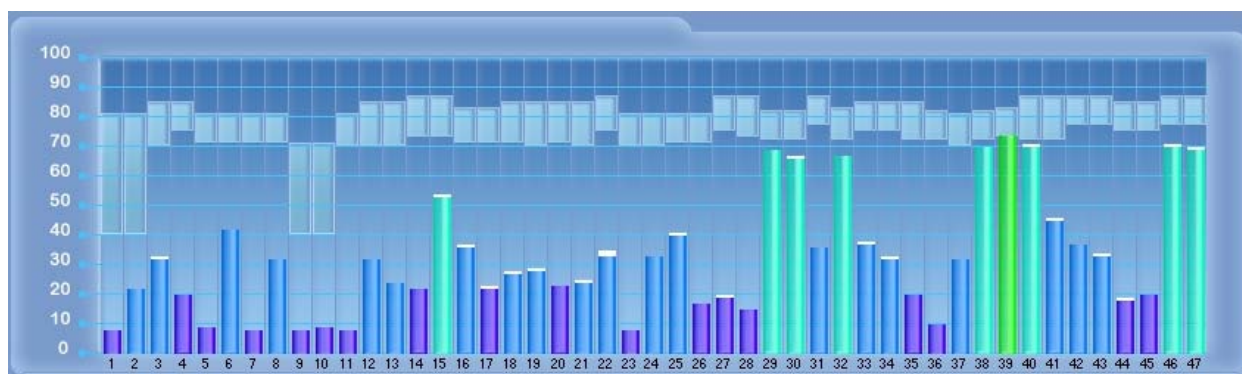


Рисунок 8. Диаграмма состояние пациента (мужчина 75 лет) в исходном состоянии: 1 – мозговое кровообращение П; 2 – мозговое кровообращение Л; 3 – венозная система, правое сердце; 4 – артериальная система, левое сердце; 5 – органы зрения, слуха П; 6 – органы зрения, слуха Л; 7 – гайморовы, фронтальные полости П; 8 – гайморовы, фронтальные полости Л; 9 – гипоталамус, 10 – гипофиз, 11 – тимус, 12 – щитовидная железа П; 13 – щитовидная железа Л; 14 – надпочечники П, 15 – надпочечники Л, 16 – грудная железа П, 17 – грудная железа Л, 18 – бронхи П, 19 – бронхи Л, 20 – легкие П, 21 – легкие Л, 22 – гортань, трахея, 23 – лимфоузлы средостения, 24 – лимфоузлы шеи, 25 – миндалины глоточного кольца П; 26 – миндалины глоточного кольца Л; 27 – селезенка, 28 – печень, 29 – желчный пузырь, 30 – желудок, 31 – 12-перстная кишка, 32 – горизонтальный отдел толстого кишечника; 33 – тонкий кишечник; 34 – восходящий отдел толстого кишечника, аппендикс; 35 – нисходящий отдел толстого кишечника, прямая кишка; 36 – поджелудочная железа; 37 – глотка, пищевод; 38 – простата (матка); 39 – мочевой пузырь; 40 – яички (яичник) П; 41 – яички (яичник) Л; 42 – почка, мочеточник П; 43 – почка, мочеточник Л; 44 – суставы рук П; 45 – суставы рук Л; 46 – суставы ног П; 47 – суставы ног Л. Высота столбиков на гистограмме и цвет соответствует рангу активности: зелёный цвет – норма, салатный лёгкая гиподисфункция, синий – гиподисфункция, фиолетовый выраженная гиподисфункция

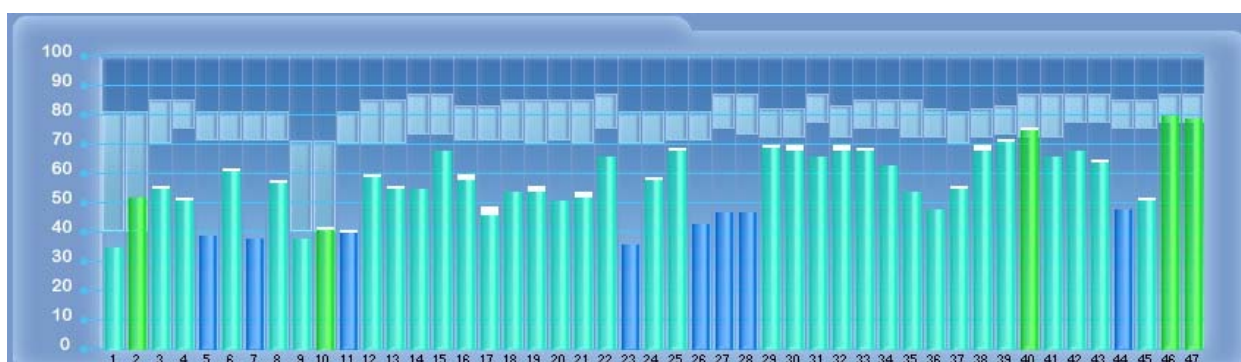


Рисунок 9. Диаграмма состояние пациента (мужчина 75 лет) после 10 мин воздействия МВП в области верхней части шеи частотами, стимулирующими микроциркуляцию - в первую очередь, капиллярное кровообращение

определенного органа, который иннервируется через данный сегмент, решение обратной задачи с помощью специального алгоритма позволяет оценить уровень *гиподисфункции*, *нормы* или же *гипердисфункции* конкретных органов. Эти результаты представляются либо в виде линейной гистограммы, либо в табличной форме.

Метод сегментарной диагностики развивается уже несколько десятков лет, а соответствующие приборы производятся различными организациями как в России, так и за рубежом.

Было естественно использовать метод сегментарной диагностики для оценки влияния МПВ на физиологические показатели организма человека. Ниже приведены результаты одного из множества экспериментов, полученные на взрослом (75 лет) добровольце. В исходном состоянии пациент испытывал чувство выраженного утомления, его тянуло ко сну (рис. 8). Это состояние физиологической гиподисфункции по большинству органов и систем отражается на гистограмме в виде гиподисфункции разных органов и систем.

После воздействия МВП в области основания черепа был зарегистрирован подъем активности большинства регистрируемых параметров (рис. 9). Эти позитивные изменения имели длительный характер и через час были выражены ещё сильнее. Испытуемый почувствовал прилив сил и готовность к активной деятельности.

Приведенный в качестве иллюстрации пример - лишь один из многих десятков примеров действия МПВ на физиологический статус испытуемых.

Обсуждение представленных результатов.

Естественно, возникает вопрос о механизме влияния векторного потенциала и модулированного векторного потенциала на химические и биологические процессы. Были проанализированы возможные первичные механизмы действия векторного потенциала на элементарные процессы переноса зарядов, аналогичные

известным эффектам Ааронова-Бома и Джозефсона [6]. В той же работе обоснована возможность использования безроторного векторного потенциала для «безсилового» информационного воздействия на биохимические процессы в живой клетке.

Физический механизм воздействия векторного потенциала основан на том, что он изменяет фазу волновой функции (ψ -функции) частицы. Действительно, волновое уравнение Шредингера для стационарного состояния заряженной частицы в поле векторного потенциала A имеет вид [11]:

$$(m/2)(-i\hbar \nabla - eA)^2 \psi + [E - U(x, y, z)]\psi = 0,$$

где $\hbar$ – постоянная Планка; e и m – заряд и масса частицы; E и $U(x, y, z)$ – её полная и потенциальная энергии; ∇ – дифференциальный оператор Набла. Его решение: $\psi = \psi_0(x, y, z) e^{i\varphi}$, где $\psi_0(x, y, z)$ – решение уравнения (1) при $A=0$, в чём легко убедиться непосредственной подстановкой этого выражения в уравнение (3). Эти решения отличаются от невозмущенных (с $A=0$) лишь сдвигом фазы волновой функции на величину: $\varphi = (e/\hbar) \int A dr$. Здесь интегрирование проводится вдоль «траектории» частицы. Важно отметить, что изменение фазы ψ – функции зависит не от $rot A$, а непосредственно от величины A [12]. Правда, фаза волновой функции не влияет на распределение плотности вероятности обнаружения *уединённой* частицы – ρ ($\rho = |\psi|^2$). Поэтому часто ошибочно полагают, что векторный потенциал вообще не способен оказать физически измеримое воздействие на заряженную частицу и в связи с этим считают уравнение Шредингера инвариантным относительно подстановки A . Однако при суперпозиции *нескольких* ψ – функций результирующая электронная плотность *зависит* от фаз составляемых функций. Это важное обстоятельство подробно обсуждается Р. Фейнманом в его знаменитых лекциях [13], но почти полностью игнорируется в нашей отечественной литературе.

Также требует объяснения и эффект независимости влияния векторного потенциала от наличия проводящего и магнитного экрана. Этот вопрос был рассмотрен в нашей работе [5]. Кроме того, было показано, что экранирование не влияет на эффект МВП при его действии на «шумящий» полупроводниковые элементы. В спектре шума достоверно и ярко присутствуют частоты, использованные для модуляции векторного потенциала. Этот эффект отличается высокой статистической достоверностью. Наличие этого эффекта не вызывает удивления, поскольку дополнительный векторный потенциал должен влиять на процессы тунелирования, происходящие в полупроводнике [1, 5, 7], а использованная модуляция – лишь способ детекции этих эффектов.

Считаем необходимым также отметить, что многие широко распространенные токовые устройства являются излучателями поля векторного потенциала. На рисунке 10 для примера приведены схемы полей линейного тока и соленоида. Биологические эффекты, вызываемые токовыми устройствами могут быть гораздо более значимыми, чем действие их электрических и магнитных составляющих. Причина заключается в том, векторный потенциал всегда сопровождает электрические токи и простирается на значительные расстояния от области их локализации, убывая с расстоянием r как r^{-1} , в отличие от магнитной индукции, убывающей как r^{-2} . Поэтому биосфера нашей планеты всегда подвержена воздействию медленно спадающего с расстоянием векторного потенциала космического происхождения. «Роторная» (вихревая) часть его мала и наблюдается в виде относительно постоянного магнитного поля и его пульсаций в виде «магнитных бурь». Основная же «безроторная» часть векторного потенциала остается нерегистрируемой, биологически более активной.

Приведенный обзор некоторых эффектов, наблюдаемых при действии дополнительного векторного потенциала в стационарной и модулированной форме, направлен на привлечение внимания к этой области физики и биофизики. Будущие исследования могут развиваться по нескольким направлениям: исследование

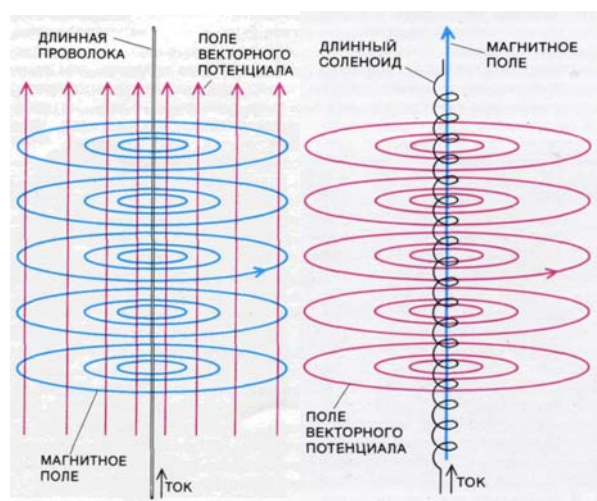


Рисунок.10. Схема полей векторного потенциала, создаваемых простейшими элементами электрических приборов

влияния ВП на структурную организацию воды и других объектов, изучение кинетики химических реакций в поле дополнительного ВП (электродинамический катализ), установление эффектов прямого влияния ВП на процессы нервной проводимости, изучение влияния ВП на внутриклеточные процессы, включая модуляцию экспрессии генов, а также и другие явления и процессы.

Список литературы /References:

1. Аносов В.Н., Трухан Э.М. Новый подход к проблеме воздействия слабых магнитных полей на живые объекты. *Докл. РАН*, 2003, т. 392, вып. 5, с. 1-5. [Anosov V. N., Trukhan E. M. a New approach to the problem of influence of weak magnetic fields on living objects. *Rep. Russian Academy of Sciences*, 2003, vol. 392, iss. 5, pp. 1-5. (In Russ.)]
2. Aharonov Y., Bohm D. Significance of electromagnetic potentials in quantum theory. *Phys. Rev.*, 1959, vol. 115, pp. 485-491.
3. Imry Y., Webb R.A. Quantum Interference and the Aharonov-Bohm Effect *Scientific American*, 1989, vol. 260.
4. Никольский В.В. *Теория электромагнитного поля*. М.: Высш. шк., 1964, 384 с. [Nikol'skiy V.V. *The theory of the electromagnetic field*. M.: Vish. Shk., 1964, 384 p. (In Russ.)]
5. Апельцин В.Ф., Полетаев А.И. О влиянии металлических экранов на поле векторного потенциала. *Инженерный журнал: наука и инновации*, 2013, вып. 9, URL: <http://engjournal.ru/catalog/mathmodel/technic/955.html>. [Apelcin V.F., Poletaev A.I. Influence of metal screens on the field of the vector potential. *Engineering journal: science and innovation*, 2013, vol. 9, URL: <http://engjournal.ru/catalog/mathmodel/technic/955.html>. (In Russ.)]
6. Трухан Э.М., Аносов В.Н. Векторный потенциал как канал информационного воздействия на живые объекты. *Биофизика*, 2007, т. 52, № 2, с. 376-381. [Trukhan E.M., Anosov V.N. Vector potential as a channel of information influence on living objects. *Biophysics*, 2007, vol. 52, no. 2, pp. 376-381. (In Russ.)]
7. Аносов В.Н., Трухан Э.М. и др. Воздействие вариации векторного потенциала на параметры моноцитарно-макрофагальной системы мышей в лабораторных условиях. *Биофизика*, 2008, т. 53, № 2, с. 378. [Anosov V.N., Trukhan E.M. et al. Effect of variation of the vector potential on the parameters of the monocyte-macrophage system of the mice in the laboratory. *Biophysics*, 2008, vol. 53, no. 2, p. 378. (In Russ.)]
8. Аносов В.Н., Трухан Э.М. Вариация векторного потенциала в лабораторных условиях изменяет биологические свойства воды. *Биофизика*, 2012, т. 57, № 3, с. 389. [Anosov V.N., Trukhan E.M. Variation of vector potential in laboratory conditions changes biological properties of water. *Biophysics*, 2012, vol. 57, no. 3, p. 389. (In Russ.)]
9. Трухан Э.М., Пилипенко П.Н. Изменение состояния кремнезёма в воде при внешних несиловых воздействиях. *Биофизика*, 2011, т. 56, № 4, с. 760. [Trukhan E.M., Pilipenko P.N. Changing the state of silica in water under external non-forceful influences. *Biophysics*, 2011, vol. 56, no. 4, p. 760. (In Russ.)]
10. Баевский Р.М. Анализ вариабельности сердечного ритма в космической медицине. *Физиология человека*, 2002, т. 28, № 2, с. 70-82. [Baevsky R.M. Analysis of heart rate variability in space medicine. *Human physiology*, 2002, vol. 28, no. 2, pp. 70-82. (In Russ.)]
11. Бойцов И.В. *Динамическая сегментарная диагностика. Руководство для врачей*. Н. Новгород: «Поволжье», 2014. [Boytsov I.V. *Dynamic segmental diagnostics. A guide for physicians*. N. Novgorod: «Povolg'e», 2014. (In Russ.)]
12. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Квантовая механика*. М.: Физматгиз, 1963, 702 с. [Landau L.D., Lifshitz E.M. *Quantum mechanics*. Moscow: Fizmatgiz, 1963, 702 p. (In Russ.)]
13. Фейнман Р., Лейтон Р., Сэндс М. *Фейнмановские лекции по физике*. Т. 9: Квантовая механика (II). М.: Мир, 1967, 259 с. [Feynman R., Leighton R., Sands M. *Feynman lectures in physics. Vol. 9: Quantum mechanics (II)*. Moscow: Mir, 1967, 259 p. (In Russ.)]

MAGNETIC VECTOR POTENTIAL AS A MODULATOR OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROCESSES

Apeltsin V.F.¹, Poletaev A.I.², Trukhan E.M.²

¹ N.E. Bauman Moscow State Technical University
Moscow, 105005, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology
Institutskii per.9, Dolgoprudnyi, 141700, Russia; e-mail: ap0068@mail.ru

Abstract. Brief review of both experimental and theoretical works carried out during last fifteen years aimed to studies of the influence of additional vector potential on the different biological and physiological processes. It was shown that the additional vector potential produced by a spatial device caused changes of water UV-absorption, silica admixture, sugar fermentation and alteration in other activities in different biological entities. Also the influence of the modulated vector potential on different human physiological parameters is presented. These examples illustrate the important role of vector potential in numerous chemical and biological processes.

Key words: vector potential, weak fields' activity, water structure, electrophysiological stimulation.

УЧАСТИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ПОДДЕРЖАНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ МОДИФИКАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА

Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Белевич Е.И., Слобожанина Е.И.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: tayzoe@mail.ru
Поступила в редакцию: 14.10.2019

Аннотация. Проведена оценка уровня экспрессии цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов и активности цистеиновой протеазы – каспазы-3 в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом до и после модификации их редокс-статуса. При физиологических условиях в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом обнаружена повышенная активность каспазы-3 по сравнению с нормальными клетками. H₂O₂-индуцированный окислительный стресс в лейкемических клетках приводил к запуску апоптотических процессов по каспазо-зависимому механизму. Установлено, что основным триггером в этом процессе могут выступать металлотионеины, как полипептиды, способные депонировать ионы цинка, и тем самым играть значительную роль в процессах, опосредованных цинковой сигнализацией, в лимфоцитах человека при хроническом В-лимфоцитарном лейкозе.

Ключевые слова: хронический В-лимфоцитарный лейкоз, металлотионеины, каспаза-3, окислительно-восстановительный баланс, цинковый гомеостаз.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из предполагаемых путей развития устойчивости опухолевых клеток к действию ксенобиотиков является увеличение содержания внутриклеточных тиолов, таких как глутатион и металлотионеины (MTs), которые связывают компоненты, токсичные для клетки. MTs млекопитающих представляют собой суперсемейство неэнзиматических полипептидов (молекулярная масса 6-7 кДа) с высоким содержанием цистеина, серы и металлов (тиолатные кластеры металлов). Именно благодаря своей уникальной структуре данные белки способны связывать (депонировать) ионы металлов (при физиологических условиях преимущественно Zn²⁺ [1]), а также инактивировать активные формы кислорода (АФК). Это свойство используется во многих реакциях и, таким образом, MTs могут выполнять важные функции в различных биохимических сигнальных каскадах [2]. На сегодняшний день не вызывает сомнения защитная роль MTs от процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза) [2–4]. В работе [3] обнаружена повышенная концентрация MTs в опухолевых клетках по периферии очага, что связано с высоким уровнем клеточной пролиферации. Такая экспрессия MTs в строме опухоли связана с её разрастанием, поскольку именно строма отвечает за рост опухоли и её агрессивность. Авторы сделали вывод, что строма злокачественной опухоли с высоким уровнем MTs защищает себя от апоптоза. При воздействии клинически значимых концентраций доксорубина (DOX) на первичную культуру кардиомиоцитов, полученную из сердечной мышцы трансгенных новорожденных мышей со сверхэкспрессией MTs, а также на культуру кардиомиоцитов от нетрансгенных животных (контроль), был выявлен высокий уровень апоптотических клеток в контроле, в то же время процессы апоптоза значительно подавлялись в трансгенных кардиомиоцитах. При этом в контрольных кардиомиоцитах наблюдался выход цитохрома *c* из митохондрий и активация каспазы-3 на фоне значительного содержания в них АФК [4]. Воздействие DOX активировало p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), участие которой является критически важным для запуска процесса апоптоза. MTs ингибировали DOX-активированную p38 MAPK, при этом антиапоптотический эффект был намного более выраженным, чем в случае обработки кардиомиоцитов специфическим ингибитором p38 MAPK – SB203580 [5]. Авторы предположили, что MTs ингибируют не только p38 MAPK-опосредованный путь, но и другие сигнальные каскады процесса апоптоза, запускаемые в ответ на DOX-индуцированный окислительный стресс [4]. Один из таких путей включает в себя активацию каспазы-3, которая происходит при выходе цитохрома *c* из митохондрий в ответ на окислительный стресс [6]. Выход цитохрома *c* в цитозоль приводит к формированию сложного комплекса (апоптосомы), состоящего из молекул цитохрома *c*, Apaf-1 (dATP-dependent apoptotic protease-activating factor-1) и прокаспазы-9, в котором неактивная прокаспаза-9 превращается в активную каспазу-9. Далее каспаза-9 протеолитически расщепляет прокаспазу-3 до активной каспазы-3 [7]. Последующее развитие процесса апоптоза связано с опосредованным каспазой-3 расщеплением белков ядерной ламины и цитоскелета клетки. Таким образом, как MTs, так и каспаза-3 способны участвовать в запуске апоптотического процесса в патологических клетках.

Целью данной работы явилось выяснение роли металлотионеинов в инициации процессов апоптоза в лимфоцитах пациентов с В-хроническим лимфоцитарным лейкозом при модификации их окислительно-восстановительного баланса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров ($n = 6$), полученная из ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий" МЗ РБ и пациентов с диагнозом хронический В-лимфоцитарный лейкоз (В-ХЛЛ, $n = 8$), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница». Все образцы крови были в консерванте «гепарин».

Периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) изолировали в градиенте гистобака-1077 путем центрифугирования крови (300g, 30 мин) и отмывок в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,4 (PBS). После выделения клетки помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2 мМ L-глутамина. Клетки инкубировали в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO_2 при температуре 37°C в течение 24 ч с агентами, модифицирующими окислительно-восстановительный баланс: N-ацетилцистеином (NAC, 200 мкМ), хлоридом цинка (ZnCl_2 , 50 мкМ) и после краткосрочного воздействия (15 мин) пероксида водорода (H_2O_2 , 100 мкМ).

Для оценки содержания МТs I/II типов ПМНК фиксировали 2%-м раствором параформальдегида (60 мин, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$), отмывали путем центрифугирования (300g, 15 мин) и проводили пермеабиллизацию мембран 0,5%-м раствором детергента твин 20 в PBS буфере (10 мин, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$). Далее проводили последовательную инкубацию клеток с первичными мышинными моноклональными антителами против металлотионеинов UC1MT (12 ч, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$) и с вторичными поликлональными козлиными антителами, конъюгированными с FITC, против мышинового IgG1 (2 ч, $t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$). В качестве изотипического контроля использовали мышинные моноклональные антитела, конъюгированные с FITC, против IgG1, которые параллельно инкубировали с исследуемыми клетками при вышеописанных условиях. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FL1-H канале и по отношению интенсивности флуоресценции комплекса UC1MT-IgG1-FITC к интенсивности флуоресценции изотипического контроля (IgG1-FITC) судили о степени экспрессии металлотионеинов в исследуемых клетках.

О жизнеспособности периферических лимфоцитов судили по степени активности каспазы-3 с помощью набора реагентов CaspGlowTM по стандартному протоколу производителя. Для этого суспензию ПМНК инкубировали с нетоксичным ингибитором каспазы-3 (FITC-DEVD-FMK) в 10 мМ HEPES-буфере pH 7,4 (60 мин, $t = 37^\circ\text{C}$), который способен проникать в клетки и необратимо связываться с активированной каспазой-3. Измерения интенсивности флуоресценции образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FL1-H канале. Апоптотическими (нежизнеспособными) считали клетки, окрашенные флуоресцентным субстратом FITC-DEVD-FMK.

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Вилкоксона и Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что эффекторная каспаза-3 относится к семейству цистеиновых аспартат-зависимых протеаз, которые в норме представлены в виде неактивных предшественников – прокаспазы-3 с молекулярным весом 32 кДа. Она способна активироваться в результате действия двух основных сигнальных путей апоптоза: рецептор-зависимого (внешнего) и митохондриального (внутреннего). После активации каспаза-3 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой соответственно 17 и 12 кДа, в функции которого входит прямое и опосредованное разрушение клеточных структур [8].

На рисунке 1 представлены репрезентативные диаграммы распределения интенсивности флуоресценции ингибитора каспазы 3 FITC-DEVD-FMK в лимфоцитах пациента с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом. Как видно из рисунка, содержание интактных клеток в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ, не окрашенных ингибитором для каспазы 3 (жизнеспособных клеток), составило в среднем 75-85%, т.е. 15-25% интактных клеток находилось в стадии апоптоза (рис. 2). Стоит отметить, что для лимфоцитов доноров данный параметр составил в среднем 5-10% (данные не представлены), что указывает на повышенную чувствительность клеток пациентов с В-ХЛЛ к развитию процессов спонтанного апоптоза при физиологических условиях *in vitro*.

Известно, что ионы цинка участвуют в защите биологических структур от окислительного стресса путем поддержания определенного уровня глутатиона и количества металлотионеинов, взаимодействуя с ионами других переходных металлов и т.д. [9]. С другой стороны, при увеличении внутриклеточной лабильной концентрации Zn^{2+} на 50 нМ данный микроэлемент проявляет прооксидантные свойства [10, 11]. Соответственно, содержание ионов цинка в клетке тесно связано с ее окислительно-восстановительным балансом, а ответ клетки контролируется преимущественно внутриклеточным «лабильным» пулом ионов цинка. Нами установлено, что инкубация *in vitro* лимфоцитов пациентов при В-ХЛЛ с хлоридом цинка в концентрации 50 мкг/мл в течение 24 ч приводила к незначительному снижению количества жизнеспособных клеток в среднем на 5-10% по сравнению с интактными клетками (контроль), однако данные статистически не достоверны (рис. 2).

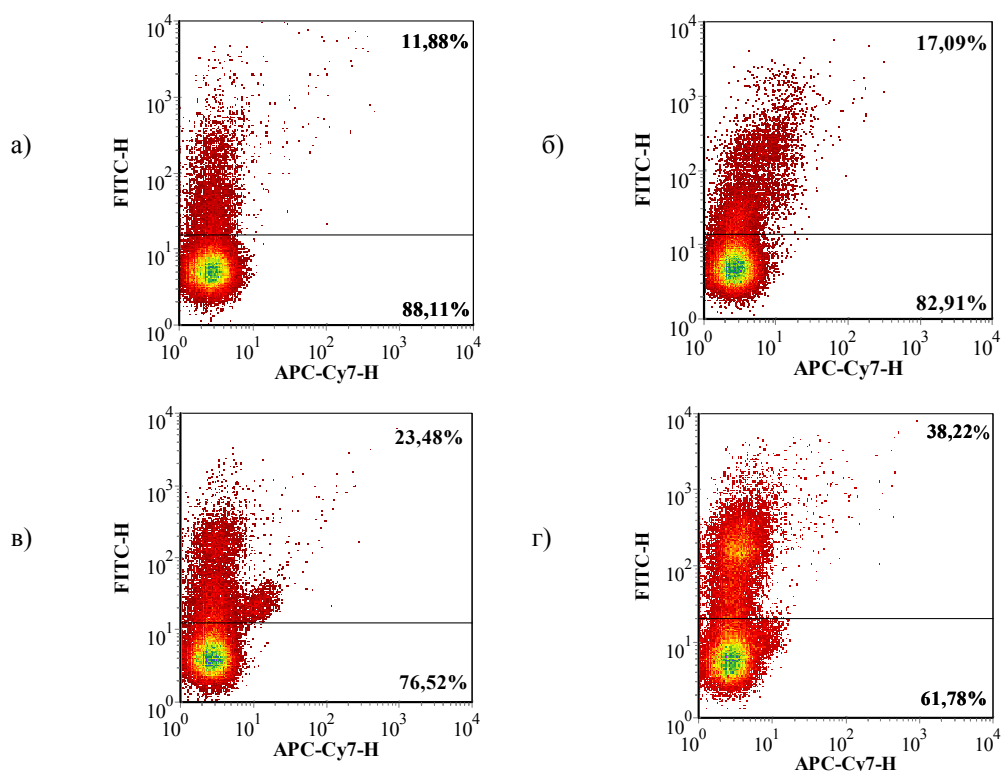


Рисунок 1. Репрезентативные диаграммы распределения интенсивности флуоресценции субстрата каспазы 3 FITC-DEVD-FMK в лимфоцитах пациента с В-ХЛЛ а – диаграмма распределения интенсивности флуоресценции FITC-DEVD-FMK в интактных лимфоцитах пациента с В-ХЛЛ (контроль); б – после воздействия $ZnCl_2$ (50 мкг/мл); в – после воздействия NAC (200 мкМ); г – после воздействия H_2O_2 (100 мкМ); (по оси ординат – интенсивность флуоресценции FITC-DEVD-FMK в усл. ед.)

Для модификации редокс-баланса в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ был использован пероксид водорода в качестве оксиданта. Известно, что при воздействии на клетки H_2O_2 окислительные процессы в них начинаются незамедлительно после его добавления *in vitro* и быстро достигают плато в отличие от эффектов, индуцированных трет-бутилгидропероксидом, которые развиваются медленно и усиливаются со временем. В качестве антиоксиданта был использован N-ацетилцистеин (NAC), который является одним из предшественников GSH. Он способен достаточно быстро накапливаться в клетках и деацетилироваться до цистеина, что приводит к значительному увеличению внутриклеточной концентрации GSH [12, 13].

Таким образом, установлено, что модификация редокс-баланса в лейкозных клетках с помощью NAC и H_2O_2 приводила к снижению процентного содержания жизнеспособных клеток в суммарной популяции лимфоцитов при В-ХЛЛ соответственно в среднем на 10-15% и 20-25% по сравнению с контролем, причем для H_2O_2 полученные результаты статистически достоверны (рис. 2).

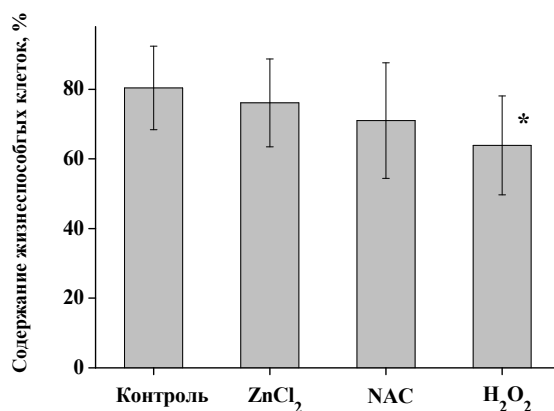


Рисунок 2. Процентное содержание лейкозных клеток, не связавшихся с флуоресцирующим ингибитором каспазы 3 – FITC-DEVD-FMK, после воздействия $ZnCl_2$, NAC и H_2O_2 *in vitro*. За контроль приняты интактные клетки, в среде инкубации которых отсутствовали $ZnCl_2$, NAC и H_2O_2 ;

* - различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Параллельно была проведена оценка содержания цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ.

На рисунке 3 представлены репрезентативные точечные диаграммы флуоресценции комплексов UC1MT-IgG1-FITC и IgG1-FITC (изотипический контроль к UC1MT) в лимфоцитах доноров (рис. 3 А, Б) и пациентов с В-ХЛЛ (рис. 3 В, Г). Известно, что UC1MT – это специфические моноклональные антитела к двум классам МТs – МТ I и МТ II. По отношению интенсивности флуоресценции комплекса UC1MT-IgG1-FITC [$I_{\text{фл}}(\text{МкАТ})$] к интенсивности флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC [$I_{\text{фл}}(\text{из. к})$], характеризующему неспецифическое связывание антител, можно судить об относительном содержании МТs в исследуемых клетках. Проведенная серия экспериментов показала, что в лимфоцитах доноров данный показатель в среднем составил $15,3 \pm 3,9$. В то время как в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ содержание МТs было снижено в среднем в 2 раза и составило $8,9 \pm 1,7$.

В свою очередь, при изменении цинкового гомеостаза лейкозных клеток (при инкубации с хлоридом цинка в концентрации 50 мкг/мл в течение 24 ч) происходит статистически достоверное увеличение содержания металлотионеинов в среднем в 2,5-3,1 раза по сравнению с интактными клетками, в среде инкубации которых отсутствовал хлорид цинка (рис. 4). Полученный результат указывает на значительную роль металлотионеинов в качестве внутриклеточных депо при поддержании гомеостаза ионов цинка в лимфоцитах с В-ХЛЛ.

Смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону антиоксидантов с помощью NAC не вызывало изменения в содержании металлотионеинов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ по сравнению с интактными клетками (рис. 4). В то же время H_2O_2 -индуцированный окислительный стресс приводил к статистически достоверному снижению уровня металлотионеинов в лейкозных клетках в среднем на 20-25% по сравнению с контролем (рис. 4).

Более того, проведенный корреляционный анализ между содержанием металлотионеинов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ после воздействия H_2O_2 и количеством жизнеспособных клеток (не окрашенных ингибитором каспазы-3) установил статистически значимую обратную зависимость ($R_s = -0,89$; $p = 0,016$). Данный факт указывает на участие металлотионеинов в запуске апоптотических процессов в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ при H_2O_2 -индуцированном окислительном стрессе. Этот результат хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о сниженной чувствительности лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ к воздействию H_2O_2 по сравнению с нормальными клетками [14], т.к. в иммунных клетках здоровых доноров содержание МТs в среднем в 2 раза выше, чем в лейкозных лимфоцитах (рис. 3).

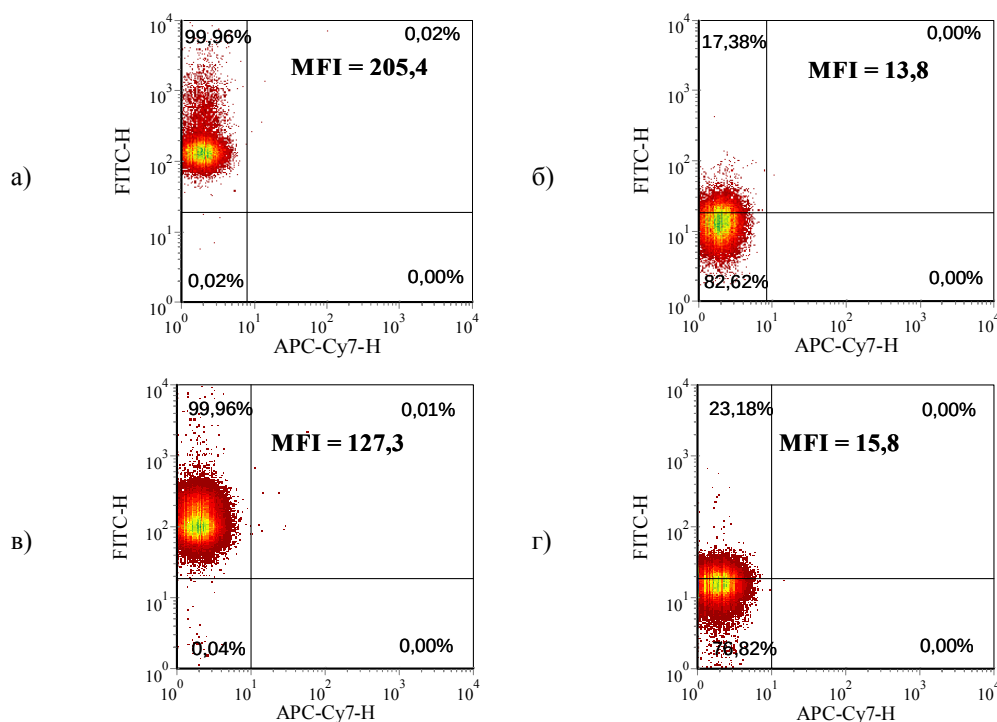


Рисунок 3. Репрезентативные диаграммы распределения интенсивности флуоресценции UC1MT-IgG1-FITC и IgG1-FITC в лимфоцитах доноров и пациентов с В-ХЛЛ. а – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции UC1MT-IgG1-FITC в лимфоцитах доноров; б – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции IgG1-FITC в лимфоцитах доноров; в – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции UC1MT-IgG1-FITC в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ; г – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции IgG1-FITC в лимфоцитах пациентов при В-ХЛЛ; по оси ординат – интенсивность флуоресценции лимфоцитов в усл. ед.

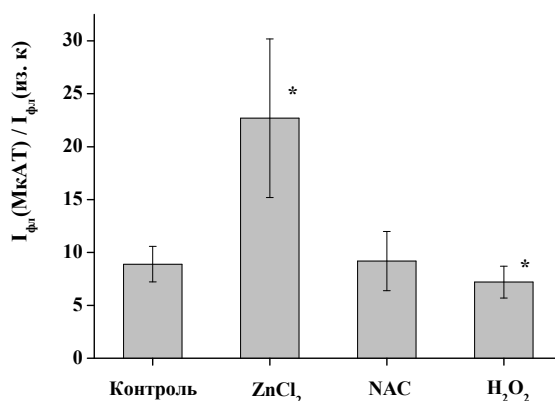


Рисунок 4. Экспрессия металлотионеинов I/II изоформ в суммарной популяции лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ после воздействия ZnCl₂, NAC и H₂O₂. I_{φ0} (MkAT) – интенсивность флуоресценции вторичных антител IgG1-FITC, связавшихся со специфическими моноклональными антителами UC1MT против металлотионеинов I и II изоформы; I_{φ0} (из. κ) – интенсивность флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC; * – различия по сравнению с контролем (интактными лимфоцитами) достоверны (p < 0,05)

Установленный факт можно объяснить тем, что MTs, как внутриклеточные цистеин-содержащие белки, депонирующие эссенциальные микроэлементы (ионы цинка и меди), способны окисляться конститутивными, мягкими проокислительными факторами, такими как окисленный глутатион или соединения селена [15, 16]. Этот процесс приводит к немедленному высвобождению ионов цинка в цитозоль, что вызывает локальное увеличение его концентрации. Повышенная концентрация лабильных ионов цинка в клетке может привести к диссипации митохондриального трансмембранного потенциала [17, 18], влекущее за собой снижение продукции АТФ [19] и, соответственно, накопление АФК [20], что, в конечном счете, вызовет гибель клеток. Полученный результат указывает на способность цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов, которые играют значительную роль в поддержании гомеостаза ионов цинка в лейкозных клетках [21, 22], выступать одним из триггеров в процессе инициации апоптоза в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ по каспазо-зависимому пути при H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при физиологических условиях в лимфоцитах пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом обнаружена повышенная активность каспазы-3 по сравнению с нормальными клетками. H₂O₂-индуцированный окислительный стресс в лейкозных клетках приводил к запуску апоптотических процессов по каспазо-зависимому механизму. А одним из основных триггеров в этом процессе могут выступать металлотионеины, как полипептиды, способные депонировать ионы цинка, и тем самым играть значительную роль в процессах, опосредованных цинковой сигнализацией, в лимфоцитах человека при хроническом В-лимфоцитарном лейкозе.

Список литературы / References:

1. Haq F., Mahoney M., Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.*, 2003, vol. 533, no. 1-2. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.014.
2. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*, 2016, № 1, с. 107-116. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Mammalian metallothioneins: structure and biological role. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus*, 2016, no. 1, pp. 107-116 (In Russ)]
3. Dutsch-Wicherek M., Sikora J., Tomaszewska R. The possible biological role of metallothionein in apoptosis. *Frontiers in Bioscience*, 2008, no. 13. DOI: 10.2741/2991.
4. Wang G.W., Klein J.B., Kang Y.J. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, vol. 298, no. 2, pp. 461-468. DOI: 0022-3565/01/2982-461-468.
5. Kang Y.J., Zhou Z.X., Wang G.W., Buridi A., Klein J.B. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 18. DOI: 10.1074/jbc.275.18.13690.
6. Pan G., Humke E.W., Dixit V.M. Activation of caspases triggered by cytochrome c *in vitro*. *FEBS Letters*, 1998, vol. 426, no. 1. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00330-5.
7. Ma Y., Ogino T., Kawabata T., Li J., Eguchi K., Okada S. Cupric nitrilotriacetate-induced apoptosis in HL-60 cells association with lipid peroxidation, release of cytochrome C from mitochondria, and activation of caspase-3. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol.27, no. 1-2. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00083-0.

8. Wu H., Che X., Zheng Q., Wu A., Pan K., Shao A., Wu Q., Zhang J., Hong Y. Caspases: A Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, vol. 10, DOI: 10.7150/ijbs.9719.
9. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Kanash J.S., Zubritskaya G.P., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. Intracellular Zinc: a Role in H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Biophysics*, 2016, vol. 61. DOI: 10.1134/S0006350916060087.
10. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Гончарова Н.В., Слобожанина Е.И. Влияние внутриклеточного уровня ионов цинка на перераспределение фосфатидилсерина в мембранах и жизнеспособность эритроцитов человека. *Новости медико-биологических наук*, 2011, т. 3, № 1, с. 90-95. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Goncharova N.V., Slobozhanina E.I. Intracellular zinc level effect on the phosphatidylserine redistribution in membranes and viability of human erythrocytes. *News of biomedical sciences*, 2011, vol. 3, no. 1, p. 90-95. (In Russ)]
11. Harmaza Y., Slobozhanina E. Zinc homeostasis and eryptosis. *FEBS Journal*, 2013, vol. 280, suppl. 1. DOI: 10.1111/febs.12339.
12. Raftos J.E., Whillier S., Chapman B.E., Kuchel P.W. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, vol. 39, no. 9. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.04.014.
13. Yildiz D., Bagdadioglu T. L-cysteine uptake is stimulated by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene *in vitro* in human erythrocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2004, vol. 14. DOI: 10.1080/10715760600602902.
14. Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I. The transport activity of P-glycoprotein upon a change of the redox balance in lymphocytes of patients with chronic B-lymphocytic leukemia. *Biophysics*, 2016, vol. 61. DOI: 10.1134/S0006350916060257.
15. Ye B., Maret W., Vallee B.L. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, vol. 98, no. 5. DOI: 10.1073/pnas.041619198.
16. Khatai L., Goessler W., Lorencova H., Zangger K. Modulation of nitric oxide-mediated metal release from metallothionein by the redox state of glutathione *in vitro*. *Eur. J. Biochem.*, 2004, vol. 271, no. 12. DOI:10.1111/j.1432-1033.2004.04160.x.
17. Dineley K.E., Votyakova T.V., Reynolds I.J. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 2003, vol. 85, no. 3. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01678.x.
18. Dineley K.E., Richards L.L., Votyakova T.V., Reynolds I.J. Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*, 2005, vol. 5, no. 1. DOI: 10.1016/j.mito.2004.11.001.
19. Dineley K.E., Scanlon J.M., Kress G.J., Stout A.K., Reynolds I.J. Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased [Zn²⁺]_i. *Neurobiology of Disease*, 2000, vol. 7, no. 4. DOI: 10.1006/nbdi.2000.0303.
20. Sensi S.L., Yin H.Z., Carriedo S.G., Rao S.S., Weiss J. H. Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺ permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, no. 5. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2414.
21. Napolitano R., De Matteis S., Lucchesi A., Carloni S., Cangini D., Musuraca G., Liardo E.V., Norata M., Fattori P.P. Pentoxifylline-Induced Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia: New Insights into Molecular Mechanism. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2018, vol. 18, no. 3. DOI: 10.2174/1389557517666171002162258.
22. Rozovski U., Harris D.M., Li P., Liu Z., Wu J.Y., Grgurevic S., Faderl S., Ferrajoli A., Wierda W.G., Martinez M., Verstovsek S., Keating M.J., Estrov Z. At High Levels, Constitutively Activated STAT3 Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Journal of Immunology*, 2016, vol. 196, no. 10. DOI: 10.4049/jimmunol.1402108.

ROLE OF METALLOTIONEINES IN MAINTAINS OF LEUKEMIC LYMPHOCYTES VIABILITY UNDER REDOX-BALANCE MODIFICATION

Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Bialevich K.I., Slobozhanina E.I.

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

Abstract. Expression of cysteine-containing low molecular weight proteins – metallothioneins and activity of cysteine protease – caspase-3 in lymphocytes of patients with chronic B-lymphocytic leukemia were evaluated before and after modification of their redox status. An increased caspase-3 activity was detected in lymphocytes of patients with B-CLL compared to normal cells under physiological condition. H₂O₂-induced oxidative stress in leukemic cells led to the activation of caspase-dependent apoptotic processes. It has been established that metallothioneins are the main triggers in this process. These polypeptides can deposit zinc ions and thereby play a significant role in process mediated by cell zinc signaling under chronic B-lymphocytic leukemia.

Key words: chronic B-lymphocytic leukemia, metallothioneins, caspase-3, redox-state, zinc homeostasis.

СПОНТАННЫЕ И ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ КРЫС С КАРЦИНОМОЙ ПОЧКИ РА ПРИ ОЗОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Щербатюк Т.Г.^{1,2}, Чернигина И.А.², Плеханова Е.С.², Гапеев А.Б.³

¹ ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»

Проспект науки, 3, г. Пуццо, 142290, РФ; e-mail: ozone_stg@mail.ru

² ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

пл. Минина и Пожарского, 10/1, г. Нижний Новгород, 603950, РФ

³ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение

ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

ул. Институтская, 3, г. Пуццо, 142290, РФ

Поступила в редакцию: 11.11.2019

Аннотация. С использованием карциномы почки крыс РА в качестве модели экспериментальной неоплазии исследовали действие озонированного физиологического раствора и фотодинамическое действие на скорость опухолевого роста и уровень спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс. Обнаружено, что совместное парентеральное введение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л внутривентрально и 0,3% раствора «Фотосенса» интратуморально с локальным действием света с длиной волны 660 ± 10 нм в течение 10 минут вызывает статистически значимое торможение роста карциномы почки крыс и полную регрессию опухоли в 50% случаев. На 20 сутки роста карциномы почки РА комбинированное озono-фотодинамическое воздействие приводит к снижению уровня спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс по сравнению с фотодинамическим действием и действием озонированного физиологического раствора по отдельности.

Ключевые слова: повреждения ДНК, озон, фотодинамическая терапия, экспериментальная онкология.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с открытием молекулярно-генетических механизмов кислородного гомеостаза, в частности, роли индуцированного гипоксией фактора (hypoxia-inducible factor, HIF) [1], ожидается ренессанс свободнорадикальной биологии, сопровождающийся усиленным интересом к исследованиям, направленным на возможность управления свободнорадикальными процессами с терапевтической целью.

Считается, что онкогенез, возникающий в результате многоэтапной активации онкогенов и потери опухолевых супрессоров частично обусловлен нестабильностью генома в результате окислительных повреждений ДНК [2]. Резистентность опухолей к терапевтическим воздействиям, в основе которых лежит влияние на свободнорадикальные процессы, обусловлена устойчивостью бластотрансформированных клеток к окислительному стрессу за счет высокой активности антиоксидантных ферментов [3], активацией HIF-1, индукцией эндотелиального фактора роста сосудов, усилением ангиогенеза [2].

Фотодинамическая терапия (ФДТ), механизм действия которой связан с развитием свободнорадикальных реакций [4] и ингибированием HIF [1], применяется как метод лечения злокачественных новообразований в последние 40 лет во всем мире [5]. Однако низкая генерация синглетного кислорода, гипоксические условия в опухолевой ткани и ряд других ограничений препятствуют широкому применению ФДТ в клинической онкологии [6]. В связи с этим актуальной задачей является оптимизация ФДТ и поиск новых способов повышения её противоопухолевой эффективности. Принимая во внимание ключевые механизмы противоопухолевого действия озона, такие как повышение оксигенации опухолевой ткани [7], ингибирование пролиферации опухолевых клеток посредством инактивации транскрипционных факторов и усиление иммунных реакций [8], мы предположили, что комбинированное применение озонированного физиологического раствора (ОФР) с фотодинамическим воздействием может усилить деструкцию опухолевой ткани.

Цель работы состояла в оценке противоопухолевого и генотоксического действия озono-фотодинамической терапии в условиях экспериментальной неоплазии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 250 ± 25 г (возраст 2 мес.), которые содержались на стандартном пищевом рационе в виварии. Все манипуляции с экспериментальными животными проводили в соответствии с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным (Эдинбург, 2000).

В качестве модели экспериментальной неоплазии использовали карциному почки РА, полученную из банка

опухолевых штаммов РОНЦ РАМН (Москва). Опухоль относится к числу быстрорастущих с достаточно коротким инкубационным периодом, не превышающим 7-10 суток, развитие опухоли полностью завершается к 26-м суткам от момента перевивки. Карцинома почки РА характеризуется достаточно большой биомассой и высокой степенью перевиваемости. Опухоль для инокуляции брали на 14 сутки развития. Инокулом РА вводили крысам подкожно в область правого бедра [9].

Для фотодинамического воздействия использовали синтетический фотосенсибилизатор второго поколения – гидроксисилиминия трисульфоталлоцианин (препарат «Фотосенс», ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), который имеет максимум поглощения на длине волны 676 нм в спектральной области прозрачности биоткани, что позволяло воздействовать на глубокие слои опухолевой ткани. Интратуморально вводили 0,3% раствор «Фотосенса» в три точки опухоли из расчета 30% от объема опухоли. Затем через 6 ч после инъекций «Фотосенса» на каждую точку в течение 10 мин воздействовали светом с длиной волны 660 ± 10 нм и интенсивностью излучения 100 мВт/см^2 [10]. В качестве источника света использовали аппарат физиотерапевтический светодиодный АФС (ООО «Полироник», Россия). Всего провели 2 сеанса ФДТ на 15-е и 19-е сутки после перевивки опухоли, что соответствовало периоду активного роста карциномы почки крыс (рис. 1).

Действие озона осуществляли введением ОФР в течение 10 суток (5 воздействий через сутки), начиная с 10-х суток после перевивки опухолевого штамма. Внутривенно вводили по 0,5 мл ОФР с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л [11]. Инъекции ОФР животным осуществлялись сразу после барботирования изотонического 0,9%-го раствора хлорида натрия озono-кислородной смесью (рис. 1). Озono-кислородную смесь получали из медицинского сверхчистого кислорода на озонаторе «ТЕОЗОН» (РФЯЦ-ВНИИЭФ, г. Саров, Россия) [12].

Противоопухолевый эффект проводимой терапии оценивали по коэффициенту абсолютного прироста опухоли (K), который рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_o}{V_o},$$

где $V = \frac{\pi}{6} \cdot \left(\frac{d_1 + d_2}{2} \right)^3$ – объем опухоли (см^3); V_o – до воздействия; V_t – после воздействия на срок наблюдения

t , d_1 и d_2 – два взаимно перпендикулярных поперечных сечения опухоли (см) [13].

При $K > 0$ – оценивали как продолженный рост опухоли, при $-1 < K < 0$ – торможение роста опухоли, $K = -1$ – полная регрессия опухоли. Заключение о полной регрессии неоплазии делали при отсутствии видимого и пальпируемого очага.

Из эксперимента животные выводились декапитацией под наркозом и образцы венозной крови отбирались в пробирки, содержащие гепарин. Для оценки генотоксичности озono-фотодинамического воздействия на общую фракцию лейкоцитов крови крыс использовали метод "комета-тест" [14]. Основные процедуры приготовления агарозных слайдов, лизис клеток в составе агарозного геля, щелочную денатурацию ДНК, электрофорез в щелочных условиях, нейтрализацию, окрашивание ДНК красителем SYBR Green I и визуализацию изображений "комет" проводили в соответствии с протоколами "комета-теста" [15, 16]. Регистрацию и анализ изображений ДНК-комет проводили с помощью специализированного программного обеспечения. Для количественной оценки уровня повреждения ДНК использовали процентное содержание ДНК в "хвосте кометы", измеряемое отношением интенсивности флуоресценции в "хвосте кометы" к общей интенсивности флуоресценции "кометы", выраженное в процентах [17, 18]. На каждом слайде анализировали по 100 комет и из полученных данных рассчитывали среднее значение, для каждой экспериментальной точки использовали не менее 12 агарозных слайдов. Для оценки индуцированных повреждений ДНК на иммобилизованные в агарозный гель клетки

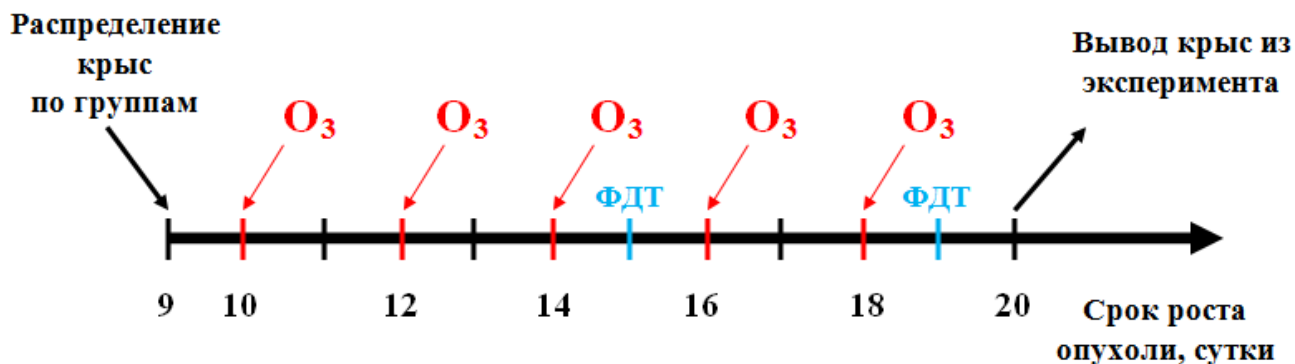


Рисунок 1. Схема комбинированного действия ФДТ и ОФР на животных-опухоленосителей

воздействовали озоном по методике, описанной в [19].

Все эксперименты проведены по протоколу "слепого контроля", когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Данные по росту карциномы РА представлены в виде Ме [25%; 75%], где Ме – медиана регистрируемого параметра, а 25% и 75% – интерпроцентильный размах. Данные по уровням повреждения ДНК представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента-Ньюмена-Кейлса при нормальном распределении данных по тесту Колмогорова-Смирнова или множественного критерия Данна при отличном от нормального распределении данных ($p < 0.016$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ роста карциномы почки крыс после проведенного фотодинамического воздействия и инъекций ОФР по отдельности показал отсутствие достоверных изменений по коэффициенту прироста опухоли (K) на 20-е сутки роста в этих экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой (без воздействия) (табл. 1). Однако следует отметить, что в этих группах по сравнению с контролем наблюдалась полная регрессия опухоли у 5 и 2 крыс соответственно (табл. 1). После комбинированного озоно-фотодинамического воздействия коэффициент прироста опухоли достоверно снижался по сравнению с контролем и наблюдалась полная регрессия опухоли у 5 животных (табл. 1).

Противоопухолевый эффект комбинированного применения ФДТ и ОФР, вероятно, связан с интенсификацией свободнорадикального гомеостаза в опухолевых клетках. Активные формы кислорода (АФК) и озониды, индуцируемые ОФР, в синергизме с механизмами фотооксигенации при ФДТ, способствуют тому, что опухоль не в состоянии сдерживать усиленное свободнорадикальное окисление, продукты которого имеют значимый ингибирующий эффект на клетки опухоли: нарушают митотическое веретено деления и останавливают клеточную пролиферацию.

При оценке уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс нами выявлено, что уровень спонтанных повреждений ДНК у животных с карциномой почки РА достоверно выше уровня спонтанных повреждений ДНК у интактных животных ($p < 0.001$) (рис. 2). Воздействия ФДТ и ОФР по отдельности не вызывали значимого снижения уровня спонтанных повреждений ДНК относительно группы «РА» (опухоленосители без воздействия), в отличие от комбинированного озоно-фотодинамического воздействия, которое приводило к статистически значимому ($p < 0.003$) снижению уровня спонтанных повреждений ДНК в лейкоцитах крови животных-опухоленосителей по сравнению с группой «РА» (рис. 2). Уровень индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс оказался значимо выше ($p < 0.001$) во всех экспериментальных группах, кроме группы животных-опухоленосителей без воздействия. ФДТ и ОФР по отдельности вызывали значительный рост уровня индуцированных повреждений ДНК ($p < 0.01$ относительно группы «РА»), а комбинированное озоно-фотодинамическое воздействие снижало уровень индуцированных повреждений ДНК до уровня у интактных крыс и животных-опухоленосителей (рис. 2).

Мы предполагаем, что наблюдаемый генотоксический эффект ФДТ может быть результатом влияния АФК и производных оксида азота (NO) на структуру молекулы ДНК лейкоцитов крови крыс-опухоленосителей [20]. Эндогенные порфирины (фотосенсибилизаторы), содержание которых в организме увеличивается при экстремальных состояниях, способны поглощать излучение в красной области спектра. В частности, лейкоциты, содержащие порфирины, являются мишенями излучения в красной области спектра, действие которого приводит

Таблица 1. Рост карциномы почки РА в контроле и при озоно-фотодинамическом воздействии.

Группы животных-опухоленосителей	Кол-во крыс в группе	Кол-во крыс с полной регрессией опухоли	Объем опухоли, см ³		K прироста
			Сутки после перевивки		
			10-е (до воздействия)	20-е (после воздействия)	
Без воздействия	10	0	0,77 [0,22; 1,77]	3,15 [0,52; 21,97]	2,85 [1,36; 11,41]
ФДТ	10	5	1,15 [0,07; 1,77]	0,23 [0,00; 33,27]	1,92 [-1,00; 17,80]
ОФР	10	2	1,77 [0,18; 2,42]	13,44 [0,24; 21,95]	3,39 [0,09; 20,36]
ФДТ+ОФР	10	5	0,52 [0,11; 2,61]	1,18 [0,00; 4,64]	-0,60* [-1,00; 1,97]

* $p < 0.014$ – достоверные отличия относительно контроля (без воздействия).

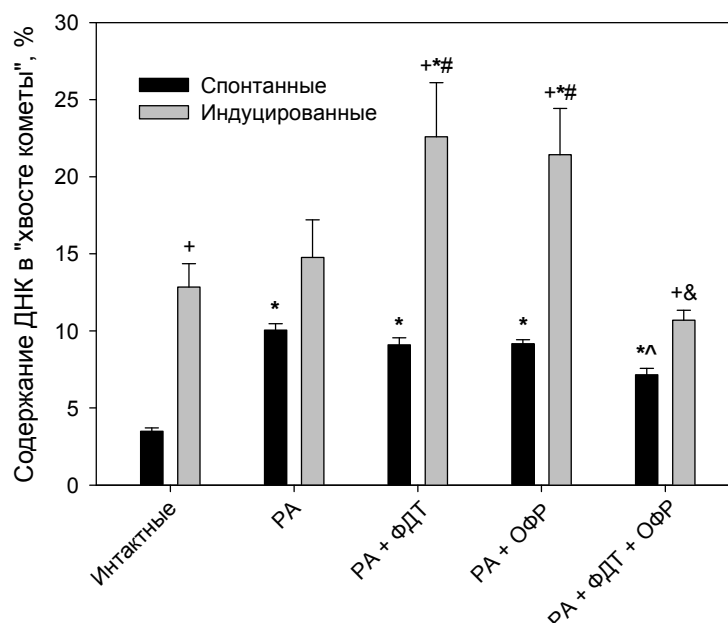


Рисунок 2. Уровень спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови intactных животных и животных-опухоленосителей (РА) после озono-фотодинамического воздействия.

* $p < 0.001$ – достоверные отличия относительно intactных животных;

^ $p < 0.003$ – достоверные отличия относительно групп «РА», «РА+ФДТ» и «РА+ОФР»;

+ $p < 0.001$ – достоверные отличия относительно уровня спонтанных повреждений;

$p < 0.01$ – достоверные отличия относительно группы "РА";

& $p < 0.01$ – достоверные отличия относительно групп "РА+ФДТ" и "РА+ОФР"

к фотосенсибилизированным свободнорадикальным реакциям, инициирующим перекисное окисление липидов в мембранах клеток. В результате увеличивается ионная проницаемость мембран для ионов Ca^{2+} , которые запускают в цитозоле лейкоцитов Ca^{2+} -зависимые реакции, приводящие к повышению уровня функциональной активности клеток (прайминг лейкоцитов). Вследствие этого лейкоциты интенсивно продуцируют NO и супероксид-анион-радикал (O_2^-). Взаимодействие NO и O_2^- приводит к образованию пероксинитрита (ONOO^-), инициирующего свободнорадикальные реакции, в результате которых индуцируются одонитевые разрывы в цепи ДНК [21-23].

При комбинированном озono-фотодинамическом воздействии, возможно, активируется транскрипционный фактор NF- κ B, вызывая экспрессию гена антиапоптотического протеина *bcl-x_l*, что приводит к увеличению данного белка в мононуклеарных лейкоцитах и ингибированию их апоптоза [24]. Это может быть следствием гиперпродукции мононуклеарными лейкоцитами интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли TNF α – ключевых цитокинов в активации механизма иммунной защиты и противоопухолевой резистентности [25].

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что совместное парентеральное введение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л внутривенно и 0,3% раствора «Фотосенса» интратуморально с локальным действием света с длиной волны 660 ± 10 нм в течение 10 минут вызывает статистически значимое снижение скорости роста карциномы почки крыс и полную регрессию опухоли в 50% случаев.

2. Установлено, что на 20 сутки роста карциномы почки РА комбинированное озono-фотодинамическое воздействие приводит к снижению уровня спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс по сравнению с фотодинамическим действием и действием озонированного физиологического раствора по отдельности.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-02-00667).

Список литературы / References:

1. Semenza G.L. Pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2019, vol. 59, pp. 379-403.

2. Gao P., Zhang H., Dinavahi R., Li F., Xiang Y., Raman V., Bhujwalla Z.M., Felsner D.W., Cheng L., Pevsner J., Lee L.A., Semenza G.L., Dang C.V. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell*, 2007, vol. 12, no. 3, pp. 230-238.
3. Козлов Ю.П., Котелевцев С.В., Новиков К.Н. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. *Медицина и высокие технологии*, 2016, № 1, с. 28-30. [Kozlov Yu.P., Kotelevtsev S.V., Novikov K.N. Free radicals and their role in normal and pathological processes. *Medicine and High Technologies*, 2016, no. 1, pp. 28-30. (In Russ.)]
4. Bhatta A.K., Keyal U., Wang X., Gellén E. A review of the mechanism of action of lasers and photodynamic therapy for onychomycosis. *Lasers Med. Sci.*, 2017, vol. 32, no. 2, pp. 469-474.
5. Якубовская Р.И., Плютинская А.Д., Лукьянец Е.А. Сравнительное изучение фотосенсибилизаторов различных классов в системе in vitro. Фталоцианины. *Российский биотерапевтический журнал*, 2014, т. 13, № 4, с. 65-72. [Yakubovskaya R.I., Plyutinskaya A.D., Lukyanets E.A. Comparative study of photosensitizers of various classes in the in vitro system. Phthalocyanines. *Russian Biotherapeutic Journal*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 65-72. (In Russ.)]
6. Sheng T., Ong Y.H., Busch T.M., Zhu T.C. Reactive oxygen species explicit dosimetry to predict tumor growth for BPD-mediated vascular photodynamic therapy. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 2019, p. 10861.
7. Щербатюк Т.Г. Озонотерапия злокачественных новообразований: за и против. *Нижегородский медицинский журнал*, 2003, № 1, с. 52-56. [Shcherbatyuk T.G. Ozone therapy of cancer: advantages and disadvantages. *Nizhny Novgorod Medical Journal*, 2003, no. 1, pp. 52-56. (In Russ.)]
8. Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J. Biolog. regulators and homeostatic agents*, 1997, vol. 10, no. 2/3, pp. 31-53.
9. Фисенко В.П. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Ремедиум, 2000. 398 с. [Fisenko V.P. *Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. Moscow, Remedium, 2000, 398 p. (In Russ.)]
10. Лагода Т.С., Каплан М.А., Бондарь А.М., Бокова М.Б., Иванов Э.А., Бровин А.И., Спиченкова О.Н. Оптимизация фотодинамической терапии солидной саркомы М1 у крыс Вистар на примере применения препарата «Фотосенс». *Вопросы онкологии*, 2005, т. 51, № 1, с. 103-107. [Lagoda T.S., Kaplan M.A., Bondar A.M., Bokova M.B., Ivanov E.A., Brovin A.I., Spichenkova O.N. Optimization of the photodynamic therapy of solid M1 sarcoma in Wistar rats using the Photosens drug as an example. *Questions of Oncology*, 2005, vol. 51, no. 1, pp. 103-107. (In Russ.)]
11. Щербатюк Т.Г., Селемир В.Д., Клинцева Е.С. *Способ повышения противоопухолевого эффекта химиотерапии*. Патент РФ № 2361590 от 24.05.2007. [Shcherbatyuk T.G., Selemer V.D., Klintsova E.S. *A way to increase the antitumor effect of chemotherapy*. RF patent no. 2361590 dated 05.24.2007. (In Russ.)]
12. Буранов С.Н., Горохов В.В., Карелин В.И., Селемир В.Д. *Устройство для озонотерапии*. Патент на изобретение RUS 2249445 от 21.04.2003. [Buranov S.N., Gorokhov V.V., Karelin V.I., Selemer V.D. *Device for ozone therapy*. Patent for invention RUS 2249445 dated 04/21/2003. (In Russ.)]
13. Ярославцева-Исаева Е.В., Каплан М.А., Романко Ю.С., Сокол Н.И. Разработка методики фотодинамической терапии экспериментальной опухоли (саркома М1) при локальном введении фотосенсибилизатора. *Российский биотерапевтический журнал*, 2003, № 2 (4), с. 19-22. [Yaroslavtseva-Isaeva E.V., Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Sokol N.I. Development of a method for the photodynamic therapy of an experimental tumor (M1 sarcoma) with local administration of a photosensitizer. *Russian Biotherapeutic Journal*, 2003, no. 2 (4), pp. 19-22. (In Russ.)]
14. Speit G., Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.*, 2006, no. 314, pp. 275-286.
15. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Сидневая Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А., Середенин С.Б., Бекиш В.Я., Чернуха И.М. *Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений*: Методические рекомендации. М.: Полиграфсервис, 2006, 27 с. [Durnev A.D., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Sidnevaya E.S., Nikitina V.A., Oganesyants L.A., Seredenin S.B., Bekish V.Ya., Chernukha I.M. *The use of the method of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess the genotoxic properties of natural and synthetic compounds*: Methodological recommendations. Moscow, Polygraphservice, 2006, 27 pp. (In Russ.)]
16. Gapeyev A.B., Lukyanova N.A., Gudkov S.V. Hydrogen peroxide induced by modulated electromagnetic radiation protects the cells from DNA damage. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2014, vol. 9, no. 10, pp. 915-921.
17. Chemeris N.K., Gapeyev A.B., Sirota N.P., Gudkova O.Yu., Kornienko N.V., Tankanag A.V., Kononov I.V., Buzoverya M.E., Suvorov V.G., Logunov V.A. DNA damage in frog erythrocytes after in vitro exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field. *Mutat. Res.*, 2004, vol. 558, no. 1-2, pp. 27-34.
18. Сирота Н.П., Кузнецова Е.А. Применение метода «комета тест» в радиобиологических исследованиях. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2010, т. 50, № 3, с. 329-339. [Sirota N.P., Kuznetsova E.A. Application of the "comet assay" method in radiobiological research. *Radiation Biology. Radioecology*, 2010, vol. 50, no. 3, pp. 329-339. (In Russ.)]
19. Чернигина И.А., Щербатюк Т.Г. Новая версия метода ДНК-комет. *Современные технологии в медицине*, 2016, т. 8, № 1, с. 20-27. [Chernigina I.A., Shcherbatyuk T.G. A new version of the DNA-comet method. *Modern Technologies in Medicine*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 20-27. (In Russ.)]

20. Чернигина И.А., Плеханова Е.С., Щербатюк Т.Г. Метод ДНК-комет в оценке уровня повреждений ДНК лейкоцитов цельной крови после фотодинамической терапии. *Современные технологии в медицине*, 2017, т. 9, № 4, с. 89-95. [Chernigina I.A., Plekhanova E.S., Shcherbatyuk T.G. The DNA-comet method for assessing the level of damage to the DNA of whole blood leukocytes after photodynamic therapy. *Modern Technologies in Medicine*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 89-95. (In Russ.)]
21. Klebanov G.I., Poltanov E.A. Primary free-radical and secondary molecular cellular mechanisms behind laser therapy. *Laser Physics*, 2003, vol. 13, no. 1, pp. 70-83.
22. Vladimirov Yu.A., Klebanov G.I., Borisenko G.G., Osipov A.N. Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect. *Biophysics*, 2004, vol. 49, no. 2, pp. 339-350.
23. Ванин А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы. *Биохимия*, 1998, т. 63, № 7, с. 867-869. [Vanin A.F. Nitric oxide in biology: history, condition and prospects. *Biochemistry (Moscow)*, 1998, vol. 63, no. 7, pp. 867-869. (In Russ.)]
24. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В., Стариков Ю.В., Филипенко М.Л., Боярских У.А. Участие факторов транскрипции p53 и NF-kB в редоксзависимых механизмах нарушения апоптоза мононуклеарных лейкоцитов. *Вестник Российской АМН*, 2009, № 4, с. 3-7. [Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Chasovskikh N.Yu., Starikova E.G., Kaygorodova E.V., Starikov Yu.V., Filipenko M.L., Boyarsky U.A. Participation of p53 and NF-kB transcription factors in redox-dependent mechanisms of apoptosis disturbance of mononuclear leukocytes. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2009, no. 4, pp. 3-7. (In Russ.)]
25. Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения. *Практическая онкология*, 2002, т. 3, № 4, с. 229-235. [Kopnin B.P. Neoplastic cell: basic properties and mechanisms of their occurrence. *Practical Oncology*, 2002, vol. 3, no. 4, pp. 229-235. (In Russ.)]

SPONTANEOUS AND INDUCED DNA DAMAGE IN BLOOD LEUKOCYTES OF RATS WITH RA KIDNEY CARCINOMA UNDER OZONE-PHOTODYNAMIC TREATMENT

Shcherbatyuk T.G.^{1,2}, Chernigina I.A.², Plekhanova E.S.², Gapeyev A.B.³

¹ Pushchino State Institute of Natural Science

Prospekt Nauki, 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: ozone_stg@mail.ru;

² Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Minin and Pozharsky Sq., 10/1, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

³ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia

Abstract. Using rat RA kidney carcinoma as a model of experimental neoplasia, the effects of ozonized saline and the photodynamic treatment on the tumor growth and the level of spontaneous and induced DNA damage in rat blood leukocytes were studied. It was found that the combined parenteral administration of an ozonized physiological solution with ozone concentration of 400 µg/L in an ozone-oxygen mixture intraperitoneally and a 0.3% Photosens solution intratumorally with local exposure to light at a wavelength of 660±10 nm for 10 min causes a statistically significant inhibition of growth of rat kidney carcinoma and complete tumor regression in 50% of cases. On the 20th day of RA kidney carcinoma growth, the combined ozone-photodynamic treatment leads to a decrease in the level of spontaneous and induced DNA damage in rat blood leukocytes in comparison with the photodynamic treatment and the action of ozonized physiological solution separately.

Key words: DNA damage, ozone, photodynamic therapy, experimental oncology.

АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТФазы И БАЛАНС ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ МОРСКИХ РЫБ В УСЛОВИЯХ ГИПООСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ (ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VIVO*)

Солдатов А. А.

ФИЦ «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН»

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию: 30.07.2019

Аннотация. В условиях эксперимента *in vivo* исследовано влияние гипоосмотической нагрузки на кровь двух видов морских рыб, отличающихся толерантностью к фактору солености. Объектами исследования служили черноморские бычки: *Gobius cobitis* (Pallas, 1814) – обнаруживается в прибрежных акваториях, лагунах устьях рек и *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) – встречается в морских и пресных водоемах. Контрольные группы рыб содержали при 12-14 ‰. Опытные группы рыб находились в течение 44-45 суток при 4,8-5,6 ‰. Температура воды поддерживалась на уровне $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Отбор проб крови осуществлялся на 1-5, 14-16 и 44-45 сутки эксперимента. Оценивали содержание воды в крови, эритроцитарные индексы, активность Na^+ , K^+ -АТФазы и баланс Na^+ и K^+ на мембране эритроцита. В условиях гипоосмотической нагрузки *G. cobitis* не проявлял признаков активной осморегуляции. Содержание воды в крови в ходе эксперимента повышалось на 9,5-14,2 % ($p < 0,001$) и сохранялось на данном уровне в течение всего периода наблюдений. Это происходило на фоне свеллинга и лизиса части эритроцитарной массы. Одновременно происходила диссипация ионных градиентов на уровне клеток красной крови и снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы. *N. melanostomus*, напротив, компенсировал начальное (1-5 сутки) повышение содержания воды в крови. У него не наблюдали признаков свеллинга и лизиса клеток красной крови. При этом эритроциты проявляли признаки активной осморегуляции. При гидратации плазмы крови у них отмечался направленный выход K^+ при сохранении содержания Na^+ в клетке. В сравнении с *G. cobitis* препараты эритроцитарных мембран *N. melanostomus* отличались повышенной активностью Na^+ , K^+ -АТФазы. Эти качества, по-видимому, позволяют данному виду переносить достаточно широкий диапазон колебания солености среды и лежат в основе его эвригалинности.

Ключевые слова: морские рыбы, гипоосмотическая нагрузка, кровь, эритроциты, баланс Na^+ и K^+ , активность Na^+ , K^+ -АТФазы.

ВВЕДЕНИЕ

Выделительная система костистых рыб представлена туловищными почками (мезонефрос), содержащих основную массу нефронов, и мочеточниками. Вместе с рядом других органов (жабры, кожа и кишечник) они обеспечивают коррекцию параметров водно-солевого обмена жидких сред организма рыб [1, 2]. В структуре почек рыб выделяют также головную почку (пронефрос). Она не участвует в поддержании осмотических характеристик крови и выполняет преимущественно гемопоэтическую функцию [3]. Выделительная система пресноводных видов направлена на удаление из организма избытка воды, а у морских рыб избытка солей [1].

Стеногалинные морские костистые рыбы являются узкоспециализированной группой организмов, адаптированной к постоянному существованию в гиперосмотических условиях среды. Они относятся к типичным осморегуляторам и имеют эффективные системы гуморального контроля водно-солевого баланса [4-6]. В сравнении с эвригалинными видами эта группа рыб выводит из организма в повышенном количестве Na^+ [7], а их клеточные системы отличаются пониженной устойчивостью к осмотическому шоку и имеют менее активную Na^+ , K^+ -АТФазу [8]. Адаптация стеногалинных морских рыб к гипоосмотической среде сопровождается гидратацией их тканей и внутренних сред, лизисом части циркулирующих эритроцитов [8], снижением содержания энергетических субстратов в тканях (глюкозы, триацилглицеридов, неэстерифицированных жирных кислот) повышением тканевого уровня лактата и т.д. [9, 10]. Последнее позволяет констатировать усиление анаэробных процессов.

У эвригалинных видов процессы осморегуляции могут быть направлены как на удержание воды, так и удаление ее избытка в зависимости от условий водной среды обитания [1]. При этом непонятна степень участия в этом системных механизмов коррекции осмолярности внутренних сред и процессов, реализуемых на уровне клеточных систем.

В настоящей работе в условиях эксперимента сравнивается реакция на гипоосмотическую нагрузку двух видов донных рыб, обитающих в градиентных условиях соленостей морской среды. *Gobius cobitis* (Pallas, 1814) – обнаруживается в прибрежных акваториях, лагунах устьях рек [11]. *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) – встречается в морских и пресных водоемах. В обоих случаях образует устойчивые во времени скопления [11].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили черноморские бычки: *Gobius cobitis* Pallas, 1814 (далее *G.c.*) и *Neogobius melanostomus* Pallas, 1814 (далее *N.m.*), особенности биологии которых рассмотрены выше.

Контрольные группы рыб содержали при солености 12-14‰. Опытные группы рыб находились в течение 44-45 суток при 4,8-5,6‰ (37-40% от исходной). Соленость воды в аквариуме понижали в течение 36 часов путем периодического приливания дистиллированной воды. Температура составляла $15 \pm 1^\circ\text{C}$ в аквариумах контрольной и опытной групп рыб. Оценка состояния особей, отбор проб крови осуществлялся на 1-5, 14-16 и 44-45 сутки эксперимента.

За 40 минут до отбора проб крови рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан. Его растворяли в воде аквариума, где находились особи. Величины эффективных доз препарата определяли с учетом температуры, солености, концентрации кислорода в воде [12].

Пробы крови получали пункцией хвостовой вены (*vena caudalis*) в шприц. В качестве антикоагулянта применяли гепарин ("Richter", Венгрия). Концентрацию гемоглобина в крови определяли при помощи гемиглобинцианидного метода, используя стандартный набор реактивов (НПО "Биолар"). Количество эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [13]. Гематокрит определяли путем центрифугирования образцов крови в гепаринизированных капиллярах (750 г; 30 минут). Центрифугирование проводили в специальном гематокритном роторе (центрифуга MPW-310, Польша). На основании полученных значений рассчитывали среднеклеточный объем (*MCV*), и среднеклеточную концентрацию гемоглобина (*MCHC*) [13].

Расчеты выполняли по следующим формулам:

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht} \cdot 10; MCV = \frac{Ht}{Er} \cdot 10,$$

где *Hb* – концентрация гемоглобина (г л^{-1}); *Er* – число эритроидных элементов (шт. мкл^{-1}); *Ht* – гематокрит (%).

Осмотическую резистентность эритроцитов оценивали при помощи микроскопического метода Яновского в концентрационном диапазоне 0.10-0.85 % NaCl [13]. Содержание воды в крови оценивали путем взвешивания на аналитических весах WP-11 (Польша) свежей и высушенной до постоянного веса при 105°C капли крови.

Плазму отделяли от форменных элементов посредством центрифугирования (750 г, 30 минут). В ней определяли концентрации Na^+ , K^+ . Эритроциты трижды отмывали от плазмы в изотонических растворах LiCl. Полученную эритроцитарную массу лизировали двумя объемами охлажденного бидистиллята. Эритроцитарную строу осаждали при 9000 g в течение 30 минут. Гемолизат использовали для последующей очистки, а также при определении внутриэритроцитарных концентраций Na^+ , K^+ . Хроматографическую очистку гемолизатов проводили на колонках с сефадексом G-75 [14]. Концентрирование образцов выполняли на мембранах фирмы "Amicon" (США) до уровня, совпадающего с таковым в цельной крови. Фрагменты эритроцитарных мембран трижды отмывали от гемоглобина в среде следующего состава: 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM гистидина (pH 7,4), и использовали при определении активности Na^+ , K^+ -АТФазы. Все операции проводили при 4°C .

Концентрации Na^+ и K^+ в плазме крови и гемолизатах определяли на пламенном фотометре ПАЖ-3 в смеси пропан-воздух [15]. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы определяли в инкубационной среде следующего состава: 3 mM Na_2ATP , 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM гистидина (pH 7,4), 5 мкг белка клеточных мембран. Общий объем – 2 мл. Реакцию начинали, добавляя Na_2ATP , и прекращали через 15 минут, добавляя трихлоруксусную кислоту в конечной концентрации 5%. В качестве ингибитора Na^+ , K^+ -АТФазы применяли оуабаин. Освобожденный неорганический фосфат (P_i) в пробе определяли по методу Фиске, Суббароу [15]. Активность выражали в микромолях $\text{P}_i \text{ ч}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка. Белок в пробе контролировали по методу Бредфорда [16].

Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводилась при помощи стандартного пакета «Grapher-7». Результаты в таблицах и на рисунках представлены как $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Сравнение выборочных совокупностей проводили на основе t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения цифровых массивов судили по критерию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперимент с G.c. Реакция клеточных систем на изменение солености была изучена на примере циркулирующих эритроцитов. Содержание воды в крови в ходе эксперимента повышалось на 9,5-14,2 % ($p < 0,001$) и сохранялось на данном уровне в течение всего периода наблюдений (табл. 1). Одновременно увеличивался среднеклеточный объем (*MCV*) на 10,6-18,1% ($p < 0,05-0,001$) и снижалась концентрация гемоглобина в эритроцитах (*MCHC*) на 5,3-12,8% ($p < 0,05-0,01$). Гематокрит, при этом, оставался на уровне контрольных значений.

Таблица 1. Содержание воды в крови и объемные характеристики циркулирующей эритроцитарной массы у *G.c.* в условиях экспериментальной гипоосмии

Условия эксперимента	n	Вода %	Ht %	MCV мкм ³	MCHC %	Hb _p г л ⁻¹
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰ 1-5 суток	8	79,7±0,9	20,5±0,4	215,2±7,1	22,7±0,7	-
14-16 суток	6	87,3±1,4	18,3±0,8	254,2±5,2	19,9±0,6	2,27±0,31
40-45 суток	8	91,0±0,9	19,3±1,0	238,0±6,5	21,5±0,7	0,64±0,28
	7	89,0±0,9	21,9±1,0	243,9±8,7	19,8±0,9	0,24±0,17

Примечание: n – число особей; Ht – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; MCHC – среднечелочная концентрация гемоглобина; Hb_p – свободный гемоглобин плазмы крови

В начальный период эксперимента (1-5 сутки) отмечали усиление внутрисосудистого лизиса. Содержание свободного гемоглобина в плазме крови достигало $2,23 \pm 0,31$ г л⁻¹. К концу опыта (40-45 суток) оно понижалось в 9,5 раз ($p < 0,001$) и составило $0,24 \pm 0,17$ г л⁻¹. Данные изменения происходили на фоне увеличения стойкости циркулирующей эритроцитарной массы к гипотоническому шоку. В сравнении с контрольной группой рыб значения минимальной и максимальной резистентности клеток красной крови понижались соответственно на 14,5 и 19,4% ($p < 0,05$) (табл. 2).

При 6,0-6,8 ‰ отмечали устойчивое снижение активности Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран (табл. 2). Различия составили 15,2-21,7% ($p < 0,05-0,01$). Клетки красной крови были не способны удерживать исходный градиент концентраций по Na⁺ и K⁺ между плазмой крови и внутриэритроцитарной средой. Концентрация Na⁺ в эритроцитах увеличивалась на 19,4-30,2 % ($p < 0,05-0,001$), а K⁺ уменьшалась на 9,0-10,8 % ($p < 0,05-0,01$). Каких-либо компенсационных реакций, направленных на восстановление активности Na⁺, K⁺-АТФазы и баланса Na⁺ и K⁺ на плазматической мембране клеток красной крови в ходе эксперимента не отмечали.

Эксперимент с N.m. Уровень воды в крови *N.m.* в начале эксперимента повышался на 8,8 % ($p < 0,001$). Однако в течение 45 суток эта величина возвращалась практически к исходным значениям ($p > 0,05$) (табл. 3). Изменение содержания воды в крови на протяжении эксперимента не оказывало заметного влияния на объемные характеристики циркулирующей эритроцитарной массы. Гематокрит, MCV и MCHC в течение опыта не претерпевали статистически значимых изменений.

Эритроциты мартовика, в сравнении с кругляшом отличались повышенной устойчивостью к гипотоническому шоку. Лизис клеток красной крови у него начинался (*min*) и заканчивался (*max*) при более низких концентрациях хлористого натрия (табл. 1 и 3). Признаков внутрисосудистого гемолиза у данного вида не наблюдали.

Препараты эритроцитарных мембран мартовика отличались также более высокой АТФазной активностью. В сравнении с кругляшом различие в активности фермента составило 18,8 % ($p < 0,001$) (табл. 2 и 4). Активность Na⁺, K⁺-АТФазы у мартовика при 6,0-6,8 ‰ в сравнении с контролем не изменялась. Увеличение содержания воды в начале эксперимента (1-5 суток) вызывало понижение концентрации Na⁺ в плазме на 21,6 % ($p < 0,001$) и изменение ионного состава эритроцитов: концентрация K⁺ понижалась на 18,2 % ($p < 0,001$), а концентрация Na⁺ оставалась на уровне контрольных величин. К концу эксперимента (40-45 суток) эти величины практически возвращались к исходным значениям ($p > 0,05$).

Таблица 2. Баланс одновалентных катионов, АТФ-азная активность эритроцитарных мембран и осмотическая резистентность клеток красной крови у *G.c.* в условиях экспериментальной гипоосмии

Условия эксперимента	n	АТФ-аза мкМ Р _i ч ⁻¹ мг ⁻¹	Na ⁺ mM		K ⁺ mM		Осмотическая резистентность % NaCl			
			с	р	с	р	n	min	max	lim
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰ 1-5 суток	8	13,8±0,6	23,2±0,9	168,7±2,3	117,3±2,3	2,83±0,05	5	0,62±0,03	0,36±0,02	0,26±0,02
14-16 суток	6	11,7±0,6	28,4±1,5	141,0±3,4	105,3±3,0	2,71±0,07	5	0,61±0,02	0,38±0,01	0,23±0,01
40-45 суток	8	10,8±0,7	30,2±1,2	135,3±3,2	104,6±2,3	2,85±0,04	5	0,54±0,02	0,31±0,02	0,23±0,01
	7	11,2±0,7	27,7±1,3	134,7±1,8	106,8±2,9	2,73±0,04	5	0,53±0,02	0,29±0,02	0,24±0,01

Примечание: n – число особей; с – эритроцит; р – плазма; lim – амплитуда резистентности эритроцитов

Таблица 3. Влияние экспериментальной гипоосмии на содержание воды в крови и объемные характеристики циркулирующей эритроцитарной массы у *N.m.*

Условия эксперимента	n	Вода %	Ht %	MCV мкм ³	MCHC %
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰	10	81,1±0,8	26,5±1,0	242,0±10,8	21,1±0,8
1-5 суток	6	88,2±1,4	26,9±1,2	255,1±13,7	20,2±0,8
14-16 суток	7	84,3±1,5	26,6±1,0	252,6±7,6	20,5±0,8
40-45 суток	8	83,7±1,2	28,8±0,8	250,4±12,4	19,9±0,9

Примечание: n – число особей; Ht – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; MCHC – среднечелочная концентрация гемоглобина;

Таблица 4. Баланс одновалентных катионов, активность Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран и осмотическая резистентность клеток красной крови у *N.m.* в условиях экспериментальной гипоосмии

Условия эксперимента	n	АТФ-аза мкМ Р _i ч ⁻¹ мг ⁻¹	Na ⁺ mM		K ⁺ mM		Осмотическая резистентность % NaCl			
			с	р	с	р	n	min	max	lim
15,0-17,0 ‰ 6,0-6,8 ‰	10	16,4±0,4	21,4±1,0	153,2±2,4	120,3±2,9	2,78±0,08	5	0,38±0,02	0,22±0,01	0,16±0,02
1-5 суток	7	15,6±0,4	19,6±0,9	120,4±2,4	98,4±2,9	3,01±0,10	5	0,39±0,02	0,21±0,02	0,18±0,01
14-16 суток	6	17,0±0,7	19,2±1,1	133,4±3,0	110,7±2,4	2,84±0,05	5	0,40±0,02	0,22±0,01	0,18±0,01
40-45 суток	8	16,2±0,5	20,4±0,8	145,0±2,1	116,8±2,0	2,75±0,06	5	0,39±0,02	0,20±0,02	0,19±0,01

Примечание: n – число особей; с – эритроцит; р – плазма; lim – амплитуда резистентности эритроцитов

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент с G.c. Как показали результаты экспериментов, *G.c.* в условиях низкой солености (40% от исходной) не проявлял признаков активной осморегуляции. Содержание воды в его крови повышалось, а концентрация Na⁺ падала. Известно, что животные допускающие значительные изменения осмолярности внутренней среды (осмоконформеры) обычно обладают эффективными механизмами клеточной осморегуляции [17, 18]. Они позволяют им существовать в достаточно широком диапазоне соленостей. Поэтому многие типичные осмоконформеры являются эвригалинными видами [17].

Из результатов собственных исследований следует, что осморегуляторные способности клеточных систем кругляша были ограничены. Об этом свидетельствовал ряд фактов:

- низкая стойкость эритроцитов к осмотическому шоку;
- значительный лизис циркулирующей эритроцитарной массы в начальный период адаптации к низкой солености (1-5 сутки);
- высокие значения среднечелочного объема эритроцитов на протяжении опыта;
- низкая активность Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран;
- снижение ионных градиентов в течение эксперимента: увеличение внутриклеточной концентрации Na⁺ и уменьшение концентрации K⁺ (на примере циркулирующих эритроцитов и клеток красных и белых мышц).

В организме *G.c.* был зарегистрирован и ряд изменений компенсационной направленности. Изначально низкая стойкость его эритроцитов к осмотическому шоку приводила к лизису части циркулирующей эритроцитарной массы (1-5 сутки). Однако к концу эксперимента (40-45 сутки) число эритроцитов в крови полностью восстанавливалось, а их осмотическая стойкость повышалась. Данная реакция, по-видимому, развивалась при участии кровяной ткани и была связана с продукцией осмотически стойких эритроцитов. Вместе с тем, это никак не сказывалось на процессах осморегуляции клеток. Среднечелочный объем оставался выше контрольных значений, а внутриклеточные концентрации Na⁺, K⁺ и активность Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитарных мембран совпадали с таковыми, отмеченными в начале эксперимента (1-5 сутки).

Таким образом, организм *G.c.* не способен к активной осморегуляции на клеточном и организменном уровнях. В этом следует усматривать основную причину его неспособности колонизировать пресноводные акватории.

Эксперимент с N.m. В отличие от *G.c.*, в организме *N.m.* в условиях низкой солености протекали активные процессы осморегуляции, направленные на поддержание исходного уровня гидратации крови.

Осморегуляторные процессы на уровне периферической крови были достаточно эффективны. Содержание воды в плазме повышалось, а концентрация Na^+ падала только в начале эксперимента (1-5 сутки) и в дальнейшем практически полностью компенсировались. При этом увеличения объема циркулирующих эритроцитов у *N.m.*, при этом, не наблюдали. Признаки внутрисосудистого лизиса клеток красной крови отсутствовали. Сравнительные исследования показали, что эритроциты *N.m.* отличались повышенной осмотической стойкостью. По-видимому, эта особенность позволяет предотвращать их лизис в момент набухания, что особенно важно в начальный период адаптации к гипоосмотической среде, когда осморегуляторные возможности организма не реализованы в полном объеме.

Известно несколько механизмов регуляции клеточного объема, которые используют морские рыбы при адаптации к гипер- или гипоосмотической среде. Один из них основан на изменении внутриклеточной концентрации Na^+ [19, 20], другой на основе изменения концентрации K^+ [21]. В ряде случаев, происходит коррекция внутриклеточной концентрации аминокислот [18]. Причины, определяющие выбор того или иного механизма клеточной осморегуляции, до конца не ясны.

Результаты настоящих исследований показали, что сохранение объема циркулирующих эритроцитов в гипотоничной среде у *N.m.* сопровождалось понижением концентрации K^+ в клетке. Уровень Na^+ оставался без изменений. Выбор данной адаптационной стратегии, по-видимому, был обусловлен ее экономичностью. Выход K^+ из клетки происходил по градиенту концентрации и не был сопряжен со значительными энерготратами.

Осморегуляция на основе уменьшения концентрации Na^+ маловероятна по двум причинам. Во-первых, концентрация данного иона в клетке невелика, а, во-вторых, выведение его за пределы эритроцита должно происходить против концентрационного градиента, то есть сопровождаться распадом АТФ.

Механизм регуляции клеточного объема на основе изменения концентрации свободных аминокислот в клетке в данном случае также маловероятен. Следует принять во внимание тот факт, что интенсивность внутриклеточного метаболизма в зрелом эритроците крайне низкая [22, 23]. Поэтому ожидать значительной активизации биосинтетических процессов, которые привели бы к снижению концентрации аминокислот в клетке не приходится. Выход аминокислот из клеток в начальный момент растяжения цитоплазматической мембраны не подкреплялся конкретными экспериментальными данными. Изменения средnekлеточного объема в 1-5 сутки действия гипоосмотического шока не наблюдали.

Следует обратить внимание на исходно более высокую активность Na^+ , K^+ -АТФазы эритроцитарных мембран *N.m.* В условиях нормальной солености (15-17‰) различия составляли 18,8% ($p < 0,01$). Данный фермент определяет активный трансмембранный перенос Na^+ и K^+ . В условиях гипоосмотической регуляции клеточного объема, когда перенос K^+ через мембрану осуществляется по градиенту концентраций, это не должно иметь особого значения. Однако при возвращении в гиперосмотические условия среды транспорт K^+ в клетки будет происходить против концентрационного градиента и высокая активность Na^+ , K^+ -АТФазы сыграет свою роль.

Таким образом, эффективные механизмы осморегуляции на клеточном и системном уровнях позволяют организму *N.m.* активно регулировать объемные характеристики клеток и степень гидратации тканей. Это позволяет данному виду переносить достаточно широкий диапазон колебания солености среды и лежит в основе его эвригалинности.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации AAAA-A18-118021490093-4)

Список литературы / References:

1. Evans D.H. A Brief History of the Study of Fish Osmoregulation: The Central Role of the Mt. Desert Island Biological Laboratory. *Frontiers of Physiology*, 2010, vol. 1, pp. 13-32.
2. Maetz J. Fish Gills: Mechanisms of Salt Transfer in Fresh Water and Sea Water. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 1971, vol. 262, no. 842, pp. 209-249.
3. Soldatov A.A. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system (review). *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2005, vol. 41, no 3, pp. 272-281.
4. Eckert S.M., Yada T., Shepherd B.S., Stetson M.H., Hirano T., Grau E.G. Hormonal control of osmoregulation in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2001, vol. 122, pp. 270-286.
5. Perrott M.N. The renin-angiotensin system and osmoregulation in fish. *Diss. Abst. Int. Pt. B Sci. Eng.*, 1989, vol. 50, p. 280.
6. Wong K.Sh. Characterization of the renin-angiotensin system in silver seabream (*Sparus sarba*): Perspective in salinity adaptation. *Diss. Abstr. Int.*, 2006, vol. 67, p. 147.
7. Avella M., Berhaut J., Bornancin M. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. 1. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. *J. Fish Biol.*, 1993, vol. 42, pp. 243-254.
8. Soldatov A.A. Peculiarities of osmoregulation of the circulating red blood cells in steno- and euryhaline marine fish species under hypoosmotic conditions. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2000, vol. 36, no 1, pp. 52-58.
9. Arjona F.J., Vargas-Chacoff L., Ruiz-Jarabo I., Goncalves O., Pascoa I., Martin del Rio M.P., Mancera J.M. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture*, 2009, vol. 287, pp. 419-426.

10. Mylonas C.C., Pavlidis M., Papandroulakis N., Zaiss M.M., Tsafarakis D., Papadakis I.E., Varsamos S. Growth performance and osmoregulation in the shi drum (*Umbrina cirrosa*) adapted to different environmental salinities. *Aquaculture*, 2009, vol. 287, pp. 203-210.
11. Световидов А.Н. *Рыбы Черного моря*. М.: Наука, 1964, 552 с. [Svetovidov A.N. *Black Sea Fish*. М.: Nauka, 1964, 552 p. (In Russ.)]
12. Soldatov A.A. Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes. *Hydrobiol. J.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 113-126.
13. Стенко М.И. *Кровь. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования*. М.: Медицина, 1975, с. 5-135. [Stenko M.I. *Blood. Handbook of clinical laboratory methods*. М.: Medicine, 1975, pp. 5-135. (In Russ.)]
14. Стародуб Н.Ф. *Методы исследования структурной гетерогенности гемоглобинов млекопитающих. Методы молекулярной биологии*. Киев: Наук. думка, 1979, с. 176-191. [Starodub N.F. *Methods of investigation of structural heterogeneity of mammalian hemoglobins. Methods of molecular biology*. Kiev: Naukova Dumka, 1979, pp. 176-191. (In Russ.)]
15. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. *Биохимические исследования в клинике*. Л.: Медицина, 1976, 384 с. [Komarov F.I., Korovkin B.F., Menshikov V.V. *Biochemical studies in the clinic*. Leningrad: Medicine, 1976, 384 p. (In Russ.)]
16. Sedmak F.F., Grossberg S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G-250. *Anat. Biochem.*, 1977, vol. 79, pp. 544-552.
17. Наточин Ю.В. *Эволюция водно-солевого обмена и почки. Эволюционная физиология (руководство по физиологии). Ч. I*. Л.: Наука, 1983, с. 371-426. [Natochin Yu.V. *Evolution of water-salt metabolism and kidneys. Evolutionary physiology (guide to physiology). Part I*. Leningrad: Nauka, 1983, pp. 371-426. (In Russ.)]
18. Fugelli K., Zachariassen K.E. The distribution of tarine, gamma-amino-butyric acid and inorganic ions between plasma and erythrocytes in flounder (*Platichthys flesus*) at different plasma osmolarities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1976, vol. 55A, pp. 173-177.
19. Наточин Ю.В., Шахматова Е.И., Лаврова Е.А., Максимович А.А., Карпенко Л.А., Мартемьянов В.И. Волюмрегуляция клеток некоторых органов и тканей у пресноводных и проходных рыб при изменении осмолярности и ионного состава сыворотки крови. *Ж. эволюц. биох. физиол.*, 1991, т. 27, № 2, с. 159-166. [Natochin Yu.V., Shakhmatova E.I., Lavrova E.A., Maksimovic A.A., Karpenko L.A., Martemyanov V.I. Volumerelative cells of some organs and tissues from freshwater and anadromous fish when you change the osmolarity and ionic composition of blood serum. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 1991, vol. 27, no. 2, pp. 159-166. (In Russ.)]
20. Hebab S.A., Hanke W. Electrolyte changes and volume regulatory processes in the carp (*Cyprinus carpio*) during osmotic stresses. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 71A, no 2, pp. 157-164.
21. Лаврова Е.А., Наточин Ю.В., Шахматова Е.И. Электролиты в тканях осетровых и костистых рыб в пресной и морской воде. *Вопр. ихтиол.*, 1984, т. 24, № 5, с. 867-871. [Lavrov E.A., Natochin Y.V., Shakhmatova E.I. Electrolytes in the tissues of sturgeon and bony fish in fresh and sea water. *J. Ichthyology*, 1984, vol. 24, no. 5, pp. 867-871. (In Russ.)]
22. Bachand L., Leray C. Erythrocyte metabolism in the yellow perch. I. Glycolytic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1975, vol. 50 B, pp. 567-570.
23. Leray C. Patterns of purine nucleotides in some North sea fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 71B, no 1, pp. 77-81.

THE ACTIVITY OF Na⁺, K⁺-ATPase AND THE BALANCE OF MONOVALENT CATIONS IN NUCLEAR ERYTHROCYTES OF MARINE FISH UNDER HYPOOSMOTIC LOAD (EXPERIMENTS *IN VIVO*)

Soldatov A. A.

FRC "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas RAN»

Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia, E-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Abstract. The effect of hypoosmotic load on the blood of two species of marine fish, characterized by tolerance to the salinity factor, was studied *in vivo* experiment. The objects of study were the Black Sea gobies: *Gobius cobitis* (Pallas, 1814) – found in coastal waters, lagoons, estuaries and *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) – found in marine and fresh water. The control group of fish was kept at 12-14‰. Experimental groups of fish were within 44-45 days at 4,8-5,6‰. The water temperature was maintained at 15 ± 1°C. Blood samples were taken at 1-5, 14-16 and 44-45 days of the experiment. Estimated water content in the blood, erythrocyte indices, the activity of Na⁺, K⁺-ATPase and the balance of Na⁺ and K⁺ on the membrane of the erythrocyte. Under hypoosmotic load *G. cobitis* showed no signs of active osmoregulation. The water content in the blood during the experiment increased by 9.5-14.2% ($p < 0.001$) and remained at this level throughout the observation period. This has resulted to swelling and lysis of the red blood cell mass. Simultaneously there was a dissipation of ionic gradients at the level of red blood cells and a decrease in the activity of Na⁺, K⁺-ATPase. *N. melanostomus*, on the contrary, compensated for the initial (1-5 days) increase in blood water content. It showed no signs of swelling or lysis of red blood cells. In this case, red blood cells showed signs of active osmoregulation. At hydration of blood plasma, they had a directed yield of K⁺ while maintaining the Na⁺ content in the cell. In comparison with *G. cobitis*, preparations of erythrocyte membranes *N. melanostomus* differed increased activity of Na⁺, K⁺-ATPase. These qualities apparently to allow were tolerate *N. melanostomus* to wide range of salinity fluctuations and are the basis of its euryhalinity.

Key words: marine fish, hypoosmotic load, blood, red blood cells, the balance of Na⁺ and K⁺, activity of Na⁺, K⁺-ATPase.

О ВОЗДЕЙСТВИИ СКАЛЯРНЫХ И ВЕКТОРНЫХ КОМПОНЕНТ ЗВУКОВОГО ПОЛЯ НА РЫБ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Завьялова О.С., Ластовенко О.Р., Лисютин В.А., Лучин В.Л., Петренко Н.В.,
Рогова О.В., Рыбакова К.А., Ярошенко А.А.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 10.09.2019

Аннотация. Подводный звук, генерируемый деятельностью человека потенциально может отрицательно повлиять на водную фауну, в том числе беспозвоночных. Кроме поля звукового давления воздействие может оказывать так же и поле колебательной скорости. Современные биолого-акустические исследования показывают, что рыбы и беспозвоночные чувствительны не только к давлению, но и к уровню колебательной скорости – векторным компонентам звукового поля. Приводится классификация рыб по их чувствительности к компонентам звукового поля. Приводятся принятые в настоящее время уровни звукового поля травматического воздействия на рыб. Приводятся результаты моделирования векторного поля потока мощности в многомодовом горизонтально-слоистом волноводе мелкого моря. Моделирование поля потока мощности осуществляется «по определению», как произведение полей давления и компонент поля вектора колебательной скорости. Поля давления и колебательной скорости вычисляются методом нормальных волн. Устанавливается качественная связь между физическими и акустическими характеристиками слоистого дна и осредненными законами спадания компонент полей колебательной скорости и поля потока мощности при многомодовом характере распространения звука.

Ключевые слова: поле давления, поле колебательной скорости, поле потока мощности.

ВВЕДЕНИЕ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Подводный звук, генерируемый деятельностью человека потенциально может отрицательно повлиять на водную фауну [1]. Обычно под морской фауной подразумевают в основном млекопитающих – дельфинов, китов, а воздействие звука на значительно большую биомассу рыб и беспозвоночных, которые дают пищу млекопитающим (в том числе и людям!) оставалось без внимания.

Многие из оценок акустического воздействия, проведенные на рыбах и беспозвоночных в прошлом, не могут считаться удовлетворительными, потому что оценивалось влияние только звукового давления. Однако, кроме поля звукового давления воздействие может оказывать так же и поле колебательной скорости – градиента давления. Современные биолого-акустические исследования показывают, что рыбы и беспозвоночные чувствительны скорее не к давлению, а к уровню колебательной скорости и колебательного ускорения [1].

Статья имеет проблемный характер и составлена из двух частей. В первой части дается обзор современной литературы, отражающей результаты исследований биологического действия звука на морскую фауну. Во второй части приводятся результаты собственных исследований – представляются методы и результаты расчетов относительных уровней колебательной скорости и потоков мощности в условиях волновода мелкого моря

1. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Звуковое давление – это гармонически меняющееся превышение давления над его равновесным гидростатическим значением. Звуковое давление измеряется гидрофонами и по абсолютной величине составляет сотни паскалей. Колебательная скорость является градиентом давления и отражает факт, что частички среды движутся от большего давления к меньшему. В гармонической волне колебательная скорость (КС) осциллирует вокруг среднего нулевого значения. КС – векторная величина. При наличии нескольких источников звука, или одного, но в волноводных условиях мелкого моря частички среды описывают сложные траектории, в среднем никуда не перемещаясь. КС измеряется особыми датчиками, представляющими собой взвешенные в жидкости соколеблющиеся с ней шары различного размера. Внутри шара располагается чувствительная часть датчика типа акселерометра. Размер шара определяет диапазон частот, на который реагирует датчик. Идеальный датчик КС должен представлять собой частичку среды.

Полная энергия, содержащаяся в звуковой волне, складывается из потенциальной (РЕ) и кинетической КЕ энергии. Потенциальная энергия возникает в результате сжатия и расширения жидкости, и связана со звуковым давлением, кинетическая энергия вызвана движением частиц среды, и связана с КС. В отсутствие акустических границ (в условиях свободного поля, на значительном расстоянии от поверхности и дна моря) звуковое давление, излучаемое простым точечным источником, спадает по закону $1/r$, где r – расстояние от источника. Далеко от источника (в акустическом «дальнем поле»), энергии, связанные с давлением и КС равны ($КЕ = РЕ$), вблизи источника (в акустическом «ближнем поле») кинетическая энергия превышает потенциальную ($КЕ > РЕ$).

Ранние исследования предполагали, что основные органы чувств, используемые для обнаружения звука (отолитовые органы в ушах рыб и различные органы, используемые беспозвоночными) на самом деле чувствительны к КС, а не к звуковому давлению.

Органы слуха и равновесия у рыб представлены внутренним ухом, наружное ухо у них отсутствует. Внутреннее ухо состоит из трех полукружных каналов с ампулами, овального мешочка и круглого мешочка с выступом (лагеной). Рыбы – единственные позвоночные с двумя или тремя парами отолитов, или ушных камешков, которые помогают поддерживать определенное положение в пространстве. У многих рыб имеется связь внутреннего уха с плавательным пузырем посредством цепи специальных косточек (веберов аппарат карповых, вьюновых и сомовых рыб) или с помощью доходящих до слуховой капсулы отростков плавательного пузыря (сельди, анчоусы, треска, многие морские караси, каменные окуни).

Тело рыбы очень близко по средней плотности и упругости к воде и, как следствие, колебания тела совпадают с колебаниями среды. Отолиты в ушах рыб функционируют как акселерометры типа «неподвижной массы», обнаруживающие это движение. При продольном, вертикальном, боковом и вращательном движениях тела рыбы происходит некоторое смещение отолитов и раздражение ими чувствительных волосков, что, в свою очередь, создает соответствующий афферентный поток. На отолиты ложатся и рецепция гравитационного поля, оценка степени ускорения рыбы при бросках. Внутреннее ухо способно воспринимать звуки частотой от десятков герц до 10 кГц. Боковая линия воспринимает сигналы только низкой частоты – от единиц до 600 герц. Но различия между двумя слуховыми системами – внутренним ухом и боковой линией не ограничиваются только расхождением в воспринимаемых частотах. Интереснее то, что эти две системы реагируют на различные составляющие звукового сигнала, и этим определяется и их разное значение в поведении рыбы. Плавательный пузырь служит хорошим резонатором, усиливая средние и низкочастотные колебания. Звуковая волна колеблет стенки плавательного пузыря, которые, в свою очередь, приводят к смещению цепочки косточек Веберова аппарата. Таким образом, если проводить аналогию с высшими наземными животными, Веберов аппарат у рыб выполняет функцию среднего уха. Однако не у всех рыб есть плавательный пузырь и Веберов аппарат. В этом случае рыбы проявляют низкую чувствительность к звуку. У беспузырных рыб слуховую функцию плавательного пузыря частично компенсируют воздушные полости, связанные с лабиринтом, и высокая чувствительность органов боковой линии к компрессионной волне.

Таким образом, сформировалась представленная в таблице 1 классификация рыб, сообразная с их чувствительностью к компонентам звукового поля.

Таблица 1. Классификация рыб и беспозвоночных по их чувствительности к компонентам звукового поля

1	Рыбы без плавательного пузыря, которые чувствительны только к КС и проявляют чувствительность только к узкой полосе частот (например, плоские рыбы - <i>Pleuronectiformes</i> ; скаты и скаты-акулы – <i>Chondrichthyes</i>)
2	Рыбы с плавательным пузырем, у которых этот орган не играет роли в слухе. Эти рыбы чувствительны только к КС и показывают чувствительность только к узкой полосе частот. Эта группа включает лососевых (<i>Salmonidae</i>) и некоторых тунцов и скумбрии (<i>Scombridae</i>), но многие другие виды, вероятно, тоже вписываются в эту категорию.
3	Рыбы с плавательными пузырями, который близко, но не тесно связан внутренним ухом. Эти рыбы чувствительны как к КС, так и к звуковому давлению, и показывают более широкий диапазон частот по чувствительности, чем группы 1 или 2, распространяющийся примерно до 500 Гц. В эту группу входят трески (<i>Gadidae</i>), угри (<i>Anguillidae</i>), (<i>Sciaenidae</i>) и, возможно, другие рыбы.
4	Рыбы, имеющие специальные структуры, механически связывающие плавательный пузырь с ухом. Эти рыбы в первую очередь чувствительны к звуковому давлению, хотя они также обнаруживают движение частиц. У них шире частотный диапазон, простирающийся до нескольких кГц и обычно демонстрирующий более высокую чувствительность к звуковому давлению, чем рыбы в группах 1, 2 или 3. Группа включает в себя <i>Holocentridae</i> , <i>Sciaenidae</i> , сельдь (<i>Clupeidae</i>).
5	Яйца и личинки

Биологические метрики, используемые для описания звука и характеризующие источник должны относиться к потенциальному воздействию на биологические объекты. Звуки разных характеристик (например, импульсный источник против непрерывного, широкополосный или узкополосный) могут давать разные воздействия. Важно определить те характеристики, которые потенциально вредны для рыб. Например, при рассмотрении потенциальных воздействий критическим уровнем может быть среднеквадратичное (RMS) звуковое давление, измеренное за интервал времени, деленное на продолжительность интервала времени, для определенного частотного спектра.

В некоторых случаях среднеквадратичное звуковое давление может использоваться для описания энергии в импульсе. Для импульсов это квадратный корень из среднего квадрата давления за время, составляют ту часть формы волны, которая содержит 90% звуковой энергии импульса. В качестве альтернативы, полная энергия импульса сложной формы может описываться уровнем звукового воздействия (SEL). SEL является интегралом по времени от квадрата звукового давления. Единица звуковой экспозиции СИ является Па²·с. SEL можно указать

для одного импульса (SELss). Однако когда импульсные звуки повторяются, целесообразно оценить совокупный SEL (SELcum). SELcum – кумулятивная, накопительная шумовая энергия, которой подвергается животное в течение определенного периода времени.

Уровни звукового давления или КС часто приводят в логарифмической шкале. Уровень LF величины поля (например, следнеквадратичное (RMS) звуковое давление или КС: $LF = 20 \lg (p/p_0)$, дБ, где p_0 – контрольное значение поля. Аналогично, уровень LP величины мощности P (например, интенсивность звука): $LP = 10 \lg (P/P_0)$, дБ. Уровни звукового давления указываются относительно $p_0 = 1$ мкПа. Движение частиц может быть выражено в терминах смещения, скорости или ускорения. Смещение частиц указывают относительно 1 пикометра, КС относительно 1 нанометра в секунду (нм/с), ускорение частиц относительно 1 мкм/с². Другой важной характеристикой импульсного звука (как по давлению, так и по КС) является время нарастания, определяемое как время, в течение которого сигнал возрастает с 10% до 90% пикового значения. Импульсы с крутым фронтом особенно травматичны [1].

Важность движения частиц. В большинстве оценок потенциального воздействия звука не уделяется внимание чувствительности рыб к движению частиц, которое сопровождает распространение звука в воде. Отсутствуют научно обоснованные данные о пороге слуха и поведенческих реакциях на движение частиц рыбами. Кроме того, нет ни стандартов измерения КС, ни легко используемых и недорогих приборов для измерения КС [1].

Обратим внимание на следующий факт. Рыбы реагируют и на давление, и на колебательную скорость. Произведение звукового давления на КС – интенсивность звука или плотность потока мощности, Вт/м². КС, в отличие от звукового давления, векторная величина, которая может быть описана заданием трех компонент, и сильно различаться по осям x, y и z (рис. 1).

На рисунке 1 вначале видно вступление компрессионной части волны давления и КС, затем, позднее – поверхностной волны.

Halvorsen и др. (2011; 2012a) описал баротравмы у рыб, подвергшихся имитации звука забивания свай и представил физиологически обоснованный подход к классификации травм, называемый FIT, который позволяет количественно определить повреждения у рыб. Модель FIT применяется математическим взвешиванием каждой травмы в зависимости от ее тяжести (коэффициенты 5, 3, 1), затем все взвешенные травмы суммируются для получения единого общего значения травмы, называемого RWI. Вес травм был определен на основе серьезности. В качестве примера можно привести рыбу с тремя травмами, одной смертельной (весовой коэффициент 5) и две легких (1), в результате чего RWI составил 7. Общая величина травм устанавливается уравнением:

$$RWI = \sum (\text{травма} \times \text{весовой коэффициент}).$$

Поскольку различные травмы могут давать один и тот же RWI, модель FIT обеспечивает возможность свести сложные данные в единое значение. Были использованы три категории травм: смертельные, умеренные и легкие. Смертельные включают разрыв плавательного пузыря и кровоизлияние в органы, умеренные травмы – ушибы органов, легкие – ушибы плавников.

По итогам исследований [2] в настоящее время приняты следующие уровни звукового поля и уровни травматического воздействия на рыб.

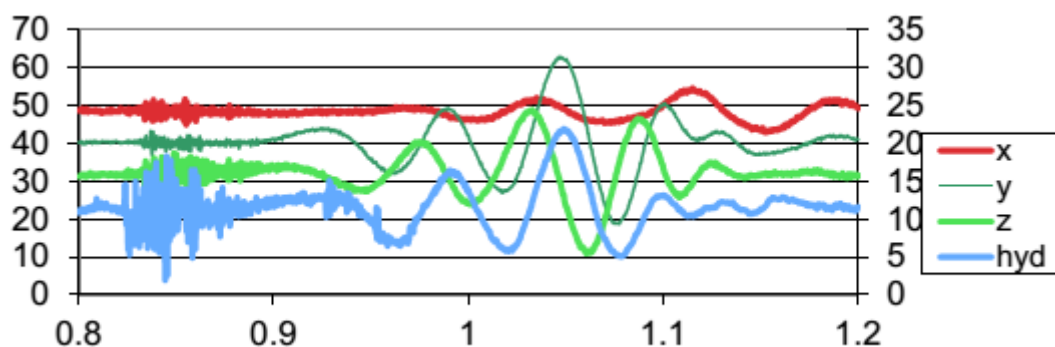


Рисунок 1. Волны звукового давления и КС. Данные записаны на расстоянии 25 метров от предмета, упавшего на дно. Три компоненты КС (x, y, z) измерены внутри донных осадков, звуковое давление (hid) – в воде чуть выше дна. Звуковое давление (правая ось) выражается в Па, а КС (левая ось) в мкм/с. Горизонтальная и вертикальная скорость составляет около 40 мкм/с при 16 Гц, в то время как амплитуда мгновенного давления составляет приблизительно 16 Па пик-пик. Источник – [2]

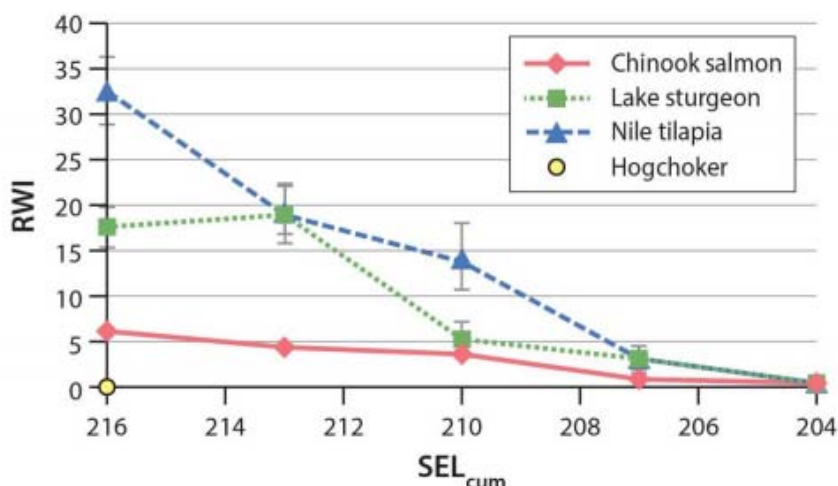


Рисунок 2. Значения RWI для четырех видов рыб. SEL_{cum} по оси X, значения RWI по оси Y. (Из Халворсена и др. 2012с)

Таблица 2. Травматическое воздействие и уровень звукового поля

Типы рыб	Смертельная и потенциально смертельная травма	Восстанавливаемая травма	Уровень стресса
1	>219 dB SEL _{cum} или > 213 dB пик	>216 dB SEL _{cum} или > 213 dB peak	>>186 dB SEL _{cum}
2	210 dB SEL _{cum} или >207 dB пик	203 dB SEL _{cum} или >207 dB пик	> 186 dB SEL _{cum}
3	207 dB SEL _{cum} или >207 dB пик	203 dB SEL _{cum} или >207 dB пик	186 dB SEL _{cum}
4	>210 dB SEL _{cum} или >207 dB пик		

2. СТРУКТУРЫ ПОЛЕЙ ДАВЛЕНИЯ, КОМПОНЕНТ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СКОРОСТИ, ПОТОКА МОЩНОСТИ И ОСРЕДНЕННЫЕ ЗАКОНЫ СПАДАНИЯ

2.1. Методы расчета

В безграничном пространстве в случае единственного источника будет существовать только одна компонента КС – радиальная. Законы спадаения относительной (давление, измеренное на расстоянии r , деленное на давление на расстоянии $r = 1$ м от монопольного источника) интенсивности давления и КС будут совпадать. Это тривиальный случай. Иначе обстоит дело в мелком море, где водный слой представляет собой волновод, ограниченный сверху полностью отражающей свободной поверхностью, снизу – частично отражающим дном. В волноводе акустическое поле «распадается» на отдельные нормальные волны или моды. Мода представляет собой волну, стоячую вдоль вертикали (в силу граничных условий на поверхности и дне) и бегущую вдоль горизонтали. Фазовая скорость различных мод неодинакова, и при интерференции мод вдоль горизонтали и вертикали образуется сложная картина чередования максимумов и минимумов поля. В плоско-слоистом волноводе будут существовать две компоненты КС – горизонтальная и вертикальная, спадающие с увеличением расстояния по различным законам.

Методы расчета полей давления в горизонтально-слоистых волноводах хорошо разработаны [2]. Полное поле КС может быть вычислено в виде суммы мод горизонтальной и вертикальной компонент. Поле КС отдельной моды можно получить, используя дифференциальную связь между горизонтальной u_r и вертикальной u_z компонентами КС и акустическим давлением $p(r,z)$ [3]:

$$u_z = \frac{1}{i\omega\rho} \frac{\partial p(r,z)}{\partial z}, u_r = \frac{1}{i\omega\rho} \frac{\partial p(r,z)}{\partial r}, \quad (1)$$

где p , u_r , u_z – комплексные амплитуды давления и соответствующей компоненты КС.

При многомодовом характере распространения звука, поле потока мощности $I(r,z)$ в волноводе может быть вычислено «по определению», как произведение поля давления и компонент поля колебательной скорости [3]

$$I_{r,z} = \frac{1}{2} \operatorname{Re}(p^* u_{r,z}) = \frac{1}{2} |p u_{r,z}| \cos(\arg(p) - \arg(u_{r,z})), \quad (2)$$

где $*$ – символ комплексного сопряжения.

Комплексная амплитуда поля акустического давления в водном слое в виде суммы мод может быть записана в виде

$$p = \sum_{l=1}^{l_m} p_l(r, z) = \sum_{l=1}^{l_m} Q_l p_l(z) H_0^{(1)}(\xi_l r), \quad (3)$$

где l_m – максимальный номер моды; $p_l(z)$ – вертикальные профили мод; ξ_l – горизонтальное волновое число, Q_l – коэффициенты возбуждения мод. Тогда с помощью (1) поля компонент КС могут быть представлены в виде

$$u_r(r, z) = \frac{-i}{\omega \rho^2 c} \sum_{l=1}^{l_m} u_{rl}(r, z) = \frac{-i}{\omega \rho^2 c} \sum_{l=1}^{l_m} Q_l p_l(z) \xi_l H_1^{(1)}(\xi_l r), \quad (4)$$

$$u_z(r, z) = \frac{-i}{\omega \rho^2 c} \sum_{l=1}^{l_m} u_{zl}(r, z) = \frac{-i}{\omega \rho^2 c} \sum_{l=1}^{l_m} Q_l \frac{\partial p_l(z)}{\partial z} H_0^{(1)}(\xi_l r). \quad (5)$$

Вычисляя горизонтальные волновые числа и вертикальные профили мод, например, с помощью программы «KRAKENC», осуществляя численное дифференцирование, нетрудно получить поле отдельной моды и полные поля давления и компонент КС при различных моделях слоистого дна. Перемножая затем в соответствии с (2) получаем поле вектора интенсивности. Следует обратить внимание, что поля, вычисленные по формулам (1) – (5), на самом деле следует называть «квазивекторными», поскольку компоненты поля КС получены из скалярного поля давления, как его градиенты.

Рассмотрим модели волноводов с дном с градиентом скорости звука и затухания и с водным слоем с возрастающей или убывающей по направлению ко дну скоростью звука в водном слое, что отражает летний либо зимний характер вертикального распределения скорости звука. Вертикальное распределение скорости звука в водном и донном слоях для двух типов осадочных отложений – ила и песка, показано на рисунке 2.

Физические параметры слоев приняты следующими: равновесная плотность дна $\rho_2=1400$ кг/м³ в случае ила и $\rho_2 = 2600$ кг/м³ в случае песка, $\rho_H = 2600$ кг/м³, $c_H = 2200$ м/с. Расчет акустических характеристик дна выполнен в рамках GS+EC модели [4, 5]

Рассмотрим представленные на рисунке 3 яркостные картины и горизонтальные разрезы горизонтальной и вертикальной составляющих поля колебательной скорости в наиболее благоприятном случае для распространения звука в мелком море – песчаное дно и положительный градиент скорости звука в водном слое – приповерхностный звуковой канал.

Частота 500 Гц, распространяется 26 мод, глубина источника $z_s=8$ м. Яркостная картина звукового давления в точности совпадает с картиной горизонтальной составляющей КС. Вблизи источника, на его оси, уровень вертикальной составляющей КС очень мал. Яркостные картины показывают формирование лучевой структуры поля с возможностью «заворота» лучей в градиентном слое с возвращением его в водный слой. Общее снижение

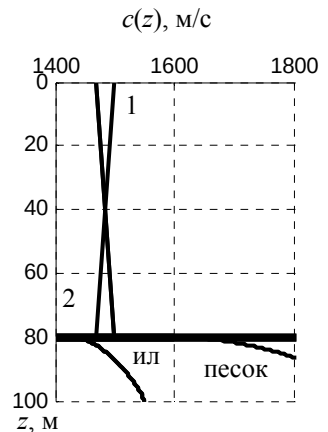


Рисунок 2. Профили скорости звука в водном слое и в дне

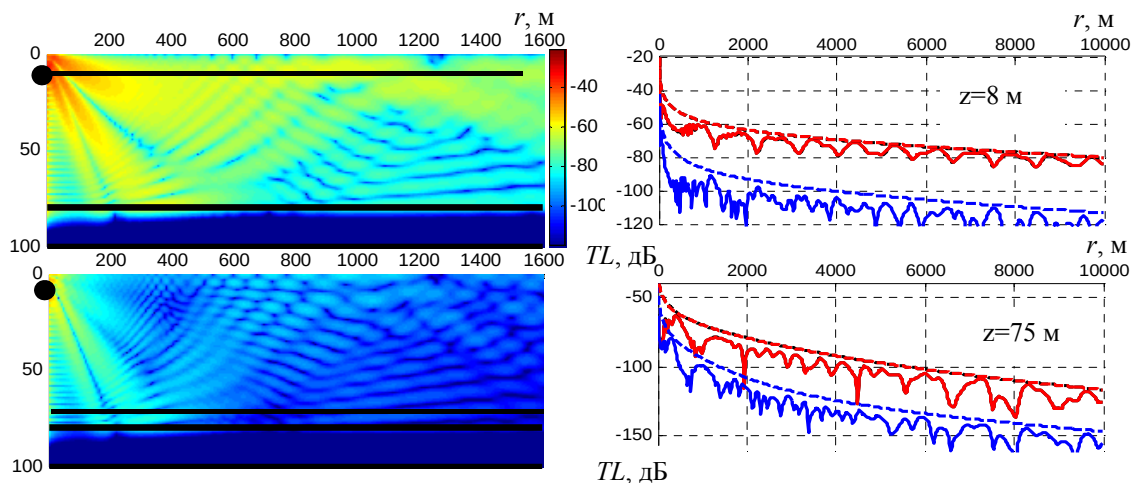


Рисунок 3. Слева - яркостные картины горизонтальной (сверху) и вертикальной (снизу) составляющих поля КС. Справа – горизонтальные разрезы полей на различных глубинах: поле давления (—), горизонтальной (---), вертикальной (....) компоненты КС, пунктир – некогерентное сложение. Грунт – песок. Горизонтальная черная линия соответствует глубине, на которой показан разрез поля – справа

уровня поля на километровой дистанции при некогерентном сложении мод составляет: на глубине $z_s = 8$ м $TL_{p,r} \approx -60$ дБ, на глубине $z_s = 75$ м $TL_{p,r} \approx -70$ дБ. Снижение уровня поля на 10-ти километровой дистанции – в приповерхностном канале $TL_{p,r} \approx -80$ дБ, в случае приемника вне канала – $TL_{p,r} \approx -115$ дБ. Разница в уровнях $TL_{p,r}$ и TL_z как на оси канала, так и вне оси примерно одинакова, максимум ее возрастает с увеличением расстояния, и при $r = 10$ км достигает ≈ 30 дБ (считая по уровням некогерентного сложения). Разница в осредненных уровнях спада поля $TL_{p,r}$ и TL_z составляет 30 дБ на оси канала и вблизи дна.

Менее благоприятный случай для распространения звука – случай отрицательного вертикального градиента – сочетание придонного звукового канала и грунта в виде песка. Соответствующие яркостные картины акустического поля и горизонтальные разрезы показаны на рисунке 4.

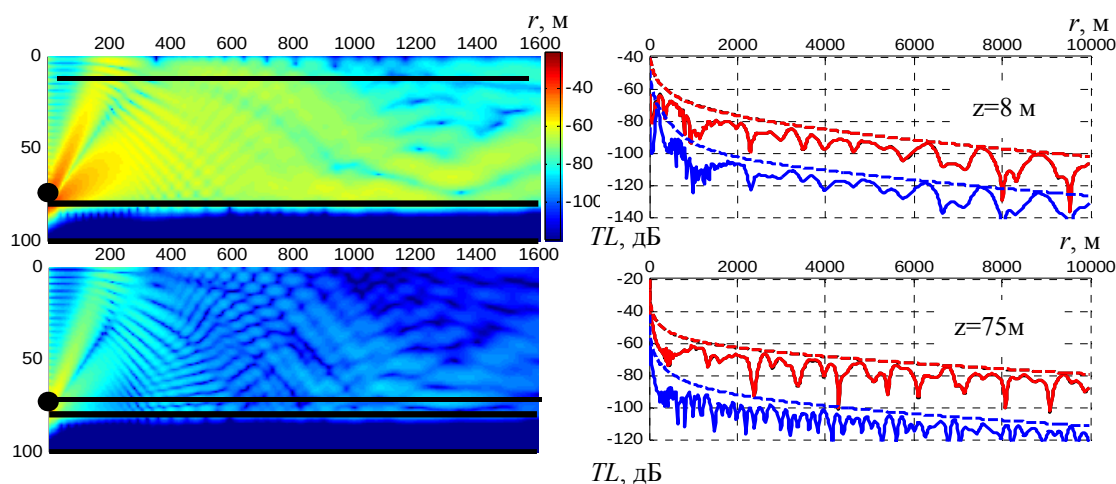


Рисунок 4. Слева – яркостные картины горизонтальной (сверху) и вертикальной (снизу) составляющих поля КС. Справа – горизонтальные разрезы полей на различных глубинах: поле давления (—), горизонтальной (—), вертикальной (—) компоненты КС, пунктир – некогерентное сложение. Грунт – песок

Источник расположен вблизи дна. Частота 500 Гц, распространяется 28 мод. Общее снижение уровня поля на километровой дистанции при некогерентном сложении мод составляет: на глубине $z_s = 8$ м $TL_{p,r} \approx -70$ дБ, что примерно на 10 дБ больше, чем в предыдущем случае, на глубине $z_s = 75$ м $TL_{p,r} \approx -60$ дБ. Снижение уровня поля на 10-ти километровой дистанции – в случае приемника в придонном канале $TL_{p,r} \approx -80$ дБ, в случае источника вне канала – $TL_{p,r} \approx -100$ дБ. Проявляется разница в уровнях $TL_{p,r}$ и TL_z на оси канала ≈ 30 дБ, и вне оси ≈ 25 дБ (считая по уровням некогерентного сложения). Разница в осредненных уровнях спада поля $TL_{p,r}$ и TL_z составляет 25 дБ на оси канала и 30 дБ вблизи дна.

Еще менее благоприятная ситуация для распространения акустических волн – илистое дно, но положительный градиент скорости звука. Соответствующие картины поля показаны на рисунке 5.

Частота 400 Гц, 24 моды. По горизонтальным разрезам поля на оси приповерхностного канала видно, что фактором, определяющим усредненный закон спада уровня поля при такой глубине волновода, является уже не характер дна, а ПСЗ – снижение уровня поля на километровой дистанции при некогерентном сложении составляет: на глубине $z_s = 8$ м $TL_{p,r} \approx -60$ дБ. Снижение уровня поля на 10-ти километровой дистанции – в случае приемника в приповерхностном канале $TL_{p,r} \approx -80$ дБ, в случае источника вне канала – $TL_{p,r} \approx -125$ дБ. Разница в уровнях $TL_{p,r}$ и TL_z на оси канала ≈ 30 дБ, вне оси ≈ 25 дБ (считая по уровням некогерентного сложения), интерференционная структура поля вследствие быстрого «высвечивания» высших мод значительно более сглажена. Минимум разницы $TL_{p,r}$ и TL_z вне канала значительно меньше, чем на оси канала.

Наиболее неблагоприятный случай – отрицательный градиент скорости звука и илистое дно. Соответствующие картины поля показаны на рисунке 6. Частота 400 Гц, 26 мод. Снижение уровня поля на 10-ти километровой дистанции более 150 дБ. Разница в уровнях $TL_{p,r}$ и TL_z на и вне оси канала ≈ 25 дБ.

Результаты моделирования поля потока мощности для двух типов дна – песок и ил показаны на рисунке 7.

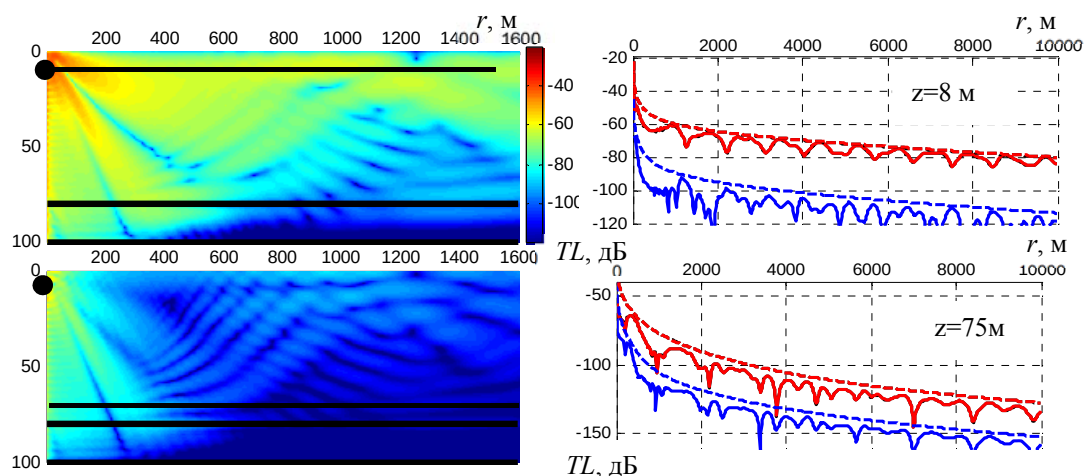


Рисунок 5. Слева - яркостные картины горизонтальной (сверху) и вертикальной (снизу) составляющих поля КС. Справа – горизонтальные разрезы полей на различных глубинах: поле давления (—), горизонтальной (---), вертикальной (—) компоненты КС, пунктир - некогерентное сложение. Грунт – ил

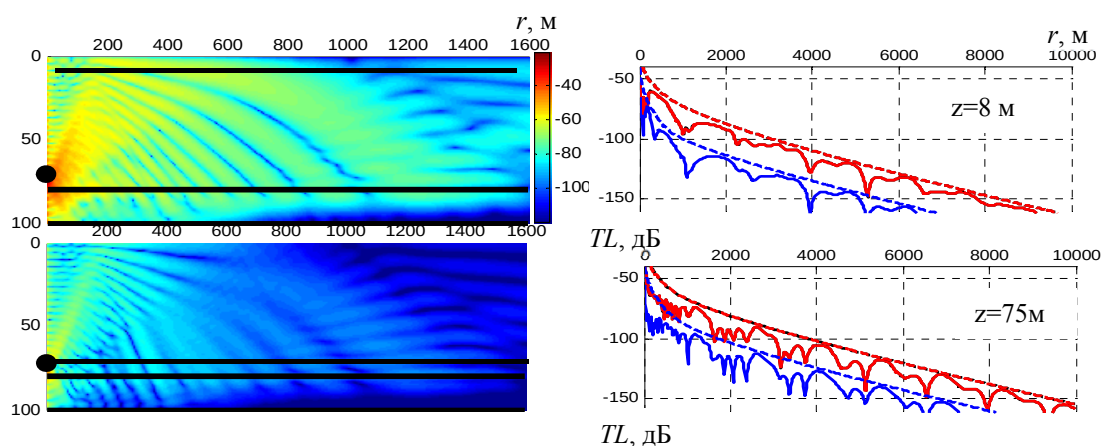


Рисунок 6. Слева - яркостные картины горизонтальной (сверху) и вертикальной (снизу) составляющих поля КС. Справа – горизонтальные разрезы полей на различных глубинах: поле давления (—), горизонтальной (---), вертикальной (—) компоненты КС, пунктир - некогерентное сложение. Грунт - ил

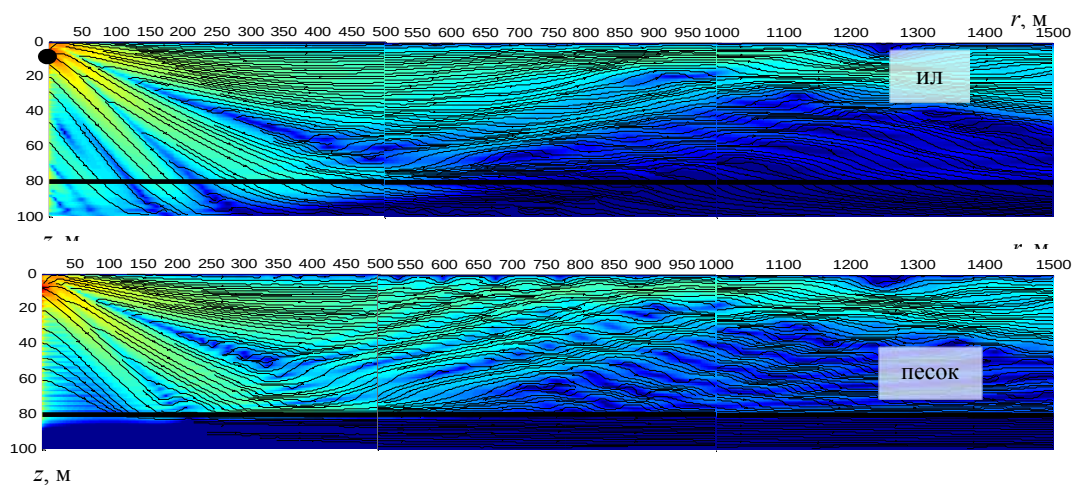


Рисунок 7. Структура поля потока мощности в волноводе с промежуточным слоем в виде ила и песка при многомодовом распространения звука (26 мод)

Как видно из рисунка 7, звуковая энергия в случае илистого дна показывает сложное поведение. С одной стороны, глубина проникновения внутрь дна оказывается больше чем в случае песчаного дна. С другой стороны, с увеличением расстояния энергия убывает быстрее.

Проведенные математические эксперименты с вариациями профиля скорости звука (положительный или отрицательный градиент) и характера дна (ил, песок), показали, что для монопольного источника, в зависимости от расположения корреспондирующих точек, разница в осредненных уровнях спадающих полей давления, горизонтальной компоненты КС и вертикальной компоненты КС составляют 20-30 дБ. Поскольку вертикальная компонента КС более «тихая», ее гораздо сложнее регистрировать экспериментально. Даже незначительное отклонение оси поляризации приемника u_z компоненты КС от вертикали приведет к «кроссполяризации» – регистрации вместо «тихой» вертикальной более «громкой» горизонтальной компоненты КС. Данное обстоятельство следует учитывать при экспериментах, связанных с выявлением различий в интерференционной структуре полей компонент КС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный численно-аналитический метод моделирования полей потоков мощности показывает хороший результат во всем частотном диапазоне, доступном для «волновых» расчетов. Моделирование возможно осуществлять для произвольных профилей скорости звука и различных моделей слоистого дна.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и города Севастополь в рамках научного проекта № 18-42-920001.

Список литературы / References:

1. Popper A.N., Hawkins A.D. The importance of particle motion to fishes and invertebrates. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2018, vol. 143, no. 1, pp. 470-488. DOI: 10.1121/1.5021594
2. Popper A.N., Hawkins A.D., Halvorsen M. B. Anthropogenic Sound and Fishes. *Research Report*, 2019, 170 p. URL: <https://www.wsdot.wa.gov/research/reports/fullreports/891-1.pdf> (date of access: 12.07.2019).
3. Ластовенко О.Р. *Скалярные и векторные акустические поля в волноводах мелкого моря*. Дис. ... к.ф.-м.н. Киев, 2013, 167 с. [Lastovenko O.R. *Scalar and vector acoustic fields in waveguides of the shallow sea*. Dis. ... Ph.D. Kiev, 2013, 167 p. (In Russ.)]
4. Лисиутин 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, 15(3), pp. 39-51. DOI: 10.31429/vestnik-15-3-39-51. (In Russ.)]
5. Лисиутин В.А. Обобщенная реологическая модель неконсолидированных морских осадков с внутренним трением и эффективной сжимаемостью. *Морской гидрофизический журнал*, 2019, т. 35, № 1, с. 85-100. DOI: 10.22449/0233-7584-2019-1-85-100 [Lisyutin, V.A. Generalized Rheological Model of the Unconsolidated Marine Sediments with Internal Friction and Effective Compressibility. *Physical Oceanography*, 2019, vol. 26, no. 1, pp. 77-91. DOI: 10.22449/1573-160X-2019-1-77-91 (In Russ.)]

ON THE EFFECT OF SCALAR AND VECTOR COMPONENTS OF THE SOUND FIELD ON FISH AND INVERTEBRATES

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

Sevastopol state university

Universitetskaya Str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: vlisiutin@mail.ru

Abstract. Underwater sound generated by human activities can potentially adversely affect aquatic animals, including invertebrates. In addition to the sound pressure field, the field of particle velocity can also have an effect. Modern biological-acoustic studies show that fish and invertebrates are sensitive not only to pressure, but also to the level of particle velocity, the vector components of the sound field. The classification of fish by their sensitivity to the components of the sound field is given. The currently accepted sound field levels of traumatic effects on fish are given. The results of modeling the vector field of the power flux in a multimode horizontal layered waveguide of the shallow sea are presented. Modeling of the power flow field is carried out “by definition”, as the product of pressure fields and field components of the particle velocity vector. The pressure and particle velocity fields are calculated using the normal mode method. A qualitative connection is established between the physical and acoustic characteristics of the layered bottom and the averaged laws of decay of the components of the fields of the particle velocity and the field of the power flux for a multimode character of sound propagation.

Key words: pressure field, particle velocity field, vector intensity field.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОСТОЯННО ДЕЙСТВУЮЩЕГО ФАКЕЛА АЧИНСКОГО НПЗ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ И ОСИНЫ

Гурова Н.Н.¹, Дигурова И.И.², Гусев С.Д.³

¹ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79/10, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: nina-guro@mail.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: digurova56@mail.ru

³ Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

ул. Партизана Железняка, 1, г. Красноярск, 660022, РФ; e-mail: sdg53@rambler.ru

Поступила в редакцию: 03.10.2019

Аннотация. В статье рассматриваются вопросы оценки влияния постоянно действующего факела по сжиганию попутных газов на Ачинском нефтеперерабатывающем заводе (АНПЗ) на близлежащее смешанное осиново-березовое насаждение с помощью альтернативных математических методов. Анализ были подвергнуты результаты измерения морфологических параметров (периметра и площади листовой пластины, а также фрактального параметра — отношения периметра к корню квадратному от площади) листья двух основных лесобразующих пород, березы и осины, в насаждении, расположенном в 500 м от объекта. Объективный анализ экспериментальных данных подразумевает не только их обычную статистическую обработку, но и применение методов, направленных на возможное обнаружение скрытой информации. В совокупности это обеспечивает надежную интерпретацию, особенно в крупных массивах данных. Оценка результатов с помощью кластерного анализа и критерия Краскела-Уоллиса позволила предположить наличие реакции на продолжительное стрессовое воздействие, возможно, направленной на оптимизацию морфометрических параметров листьев березы.

Ключевые слова: Ачинский НПЗ, факел сжигания попутных газов, осиново-березовое насаждение, морфометрия листьев.

Влияние техногенных факторов привлекает настойчивое внимание специалистов. Действие различных раздражителей может приводить к сходным ответным реакциям организмов, прежде всего, ослаблению, замедлению и приостановке роста, нарушению симметрии строения [1]. Можно предположить, что общность реакций организмов на различные по химическим и физическим свойствам загрязнители и другие антропогенные и природные стрессовые нагрузки является характерной приспособительной чертой биоты вообще [2]. Следует, однако, отметить, что недостаточно исследовано влияние веществ при многолетнем, одноместном и часто длительно одностороннем действии факелов по сжиганию попутных газов. Доступно очень мало информации, касающейся последствий их воздействия на окружающую среду. В частности, влияние факелов, действующих на обрабатывающих предприятиях, на морфологические параметры березы и осины в естественных насаждениях умеренной зоны, примыкающих к промышленным центрам, практически не изучено. Временами в целом поднимается вопрос о целесообразности биоиндикации загрязнения атмосферы урбосистем с помощью высших растений [3]. Важно также отметить, что, по-видимому, из-за традиционного использования берез как широко распространенных, неприхотливых и легко выращиваемых лиственных пород в городском и пригородном озеленении наиболее значительное число работ посвящено влиянию промышленных выбросов именно на березу. Даже тополя затрагиваются в меньшей степени. Тем более это касается «лесного тополя», осины (*Populus tremula* L.). Известно, что осина весьма требовательна к эколого-почвенным условиям, а потому очень редко используется для озеленения. Например, в работе с богатым литературным анализом, посвященной этой породе, из рассмотренного 51 источника лишь одна публикация оказалась связана с осиной [4]. Между тем эта порода часто является спутницей березы в естественных и вторичных насаждениях умеренной зоны, примыкающих к промышленным центрам.

Авторы, работавшие у невысоких факелов, сжигающих попутные газы при нефтедобыче, обращают внимание на их тепловой эффект, в том числе и в летние периоды [5]. Указывается, что в непосредственной близости от факела образуется полностью выгоревшая площадь, лишенная растительности. В наших условиях, при наличии высокого, 50-метрового факельного устройства, ничего подобного не происходит: прямо под факелом бурно развивалась растительность.

Ачинский нефтеперерабатывающий завод (АНПЗ) произвел первую продукцию в 1982 г. Он является одним из крупнейших предприятий отрасли в Сибири, на территории которого постоянно функционируют три факела. Для снижения нагрузки на окружающую среду на предприятии внедрены новые технологии, произведена модернизация оборудования, осуществляется контроль над повышением экологической безопасности.

На широте 57°, севернее Красноярска, проходит северная граница зоны так называемых травяных лесов с островами лесостепи. Исследования проводились у одного из действующих факелов для сжигания сопутствующих газов АНПЗ (Большеулуйский район Красноярского края, 56°28' с. ш., 90°34' в. д.). Высота дымовой трубы (ствола) факела составляет 50 м.

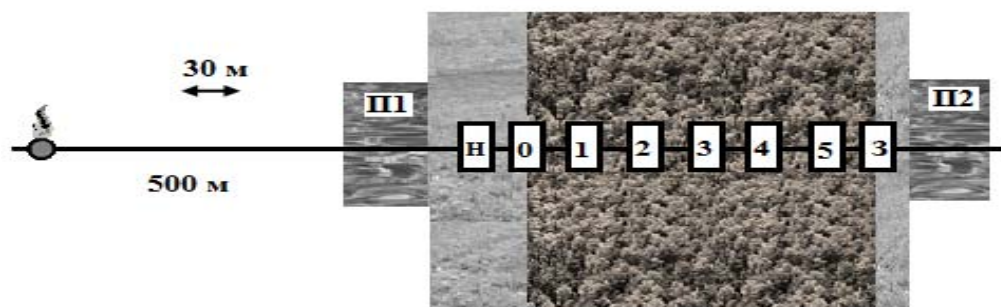


Рисунок 1. Трансекта, пересекающая колос. П1 – пруд-отстойник; Н – опушка наветренная; 0, 1, 2, 3, 4, 5 – пробные площади; 3 – опушка заветренная; П2 – пруд-шламоприемник

В качестве исследуемого объекта выбрано расположенное в 500 м от факела колкообразное смешанное насаждение, составленное березой повислой, *Betula pendula* Roth., и осинкой, *Populus tremula* L., с примесью ивы козьей, *Salix caprea* L. Насаждение находилось в вытянутом понижении 200-300 м шириной, расположенном между прудом-отстойником и прудом-шламоприемником с расстоянием до прудов не менее 150 м.

Исследование основных морфометрических показателей листы березы и осины проводилось в августе вдоль трансекты, пересекающей колос (рис. 1) со стороны, ориентированной на факел в направлении преобладающих с его стороны ветров. Начиная с отдельно стоящих деревьев перед стеной леса, на каждом 30-метровом отрезке отбиралось по одной ветви с выбранных случайным образом берез или осин, не менее чем по 25 листьев на ветвь. В результате образцы собраны в 8 точках трансекты и в точке удаленного контроля (13,5 км от факела). Общее количество исследованных образцов – 2000. При обработке материала в качестве основных признаков использовались периметр и площадь листовой пластины, а также такой фрактальный показатель, как отношение периметра к корню квадратному из площади. Периметр и площадь листьев определялись с помощью Программы для анализа изображений Digimizer. V 3.7.1.

При выполнении анализа с помощью стандартных методов описательной статистики результаты исследований на проложенной трансекте показали, что средние значения периметра и площади листьев березы в зоне предполагаемого загрязнения, а также рассчитанный на их основе фрактальный показатель (отношение периметра к корню квадратному из площади) статистически мало различимы от наветренной (подфакельной) к подветренной (защищенной) опушкам. А главное, не обнаружено различий при сравнении рассматриваемых параметров с фоновыми показателями (рис. 2). Сходные данные получены другими авторами при изучении воздействия различных факторов загрязнений. Так, например, указано, что у березы площадь и масса листьев существенно не меняются при негативном воздействии урбаноосреды [6]. При исследовании листы осины также отмечено отсутствие статистически значимых изменений средних значений изучаемых параметров вдоль трансекты (рис. 3).

Эти факты заставили предполагать либо отсутствие серьезной техногенной нагрузки, либо проявление как хорошо изученной устойчивости березы, так и слабо изученной к настоящему времени устойчивости осины к загрязнению. Однако наличие вредных воздействий в нашем случае подтверждается высокой численностью скрытоживущей группы филлофагов в подфакельной зоне по сравнению с фоновым березовым колком [7]. Это согласуется с данными литературы о том, что по мере приближения к источнику выбросов роль этой группы насекомых возрастает [8, 9]. В отношении осины таких различий отмечено не было.

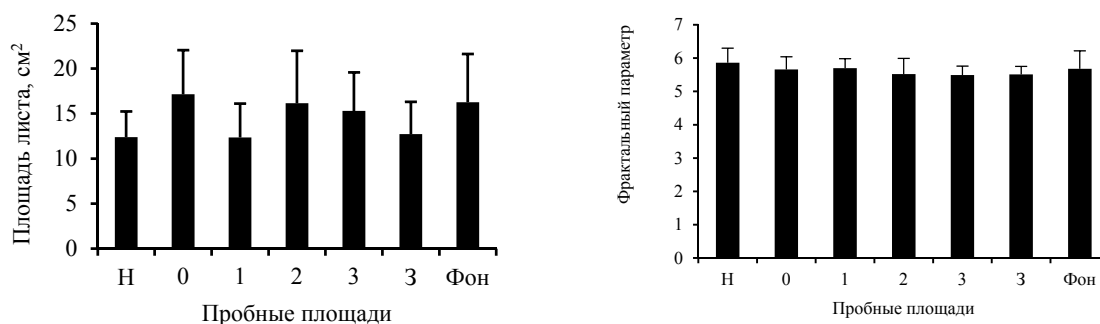


Рисунок 2. Изменение средней площади листьев березы и фрактального параметра вдоль трансекты от отдельно стоящих деревьев на Опушке Н до защищенной Опушки 3 по сравнению с Фоном (13,5 км от факела)

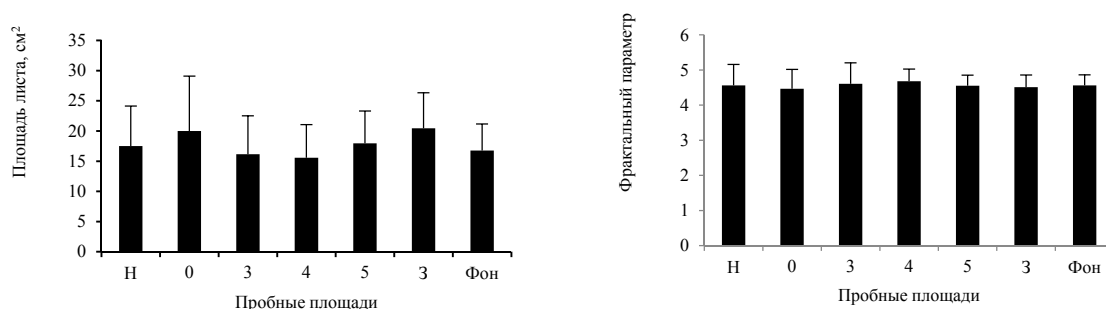


Рисунок 3. Изменение средней площади листьев осины и фрактального параметра вдоль трансекты от отдельно стоящих деревьев на Опушке Н до защищенной Опушки З по сравнению с Фоном (13,5 км от факела)

С целью возможного выявления скрытой информации об изменениях морфологических параметров листьев для обработки экспериментальных данных были применены альтернативные математические методы. В современных биологических исследованиях широко используется кластерный анализ, относящийся к data mining и дающий возможность классифицировать элементы совокупности [10, 11]. Полученные нами результаты проанализированы с помощью иерархического дивизимного метода (Divisive Analysis), позволяющего получить последовательность расщепляющих групп. Для сравнения трех или более выборок использовался непараметрический критерий Краскела-Уоллиса [12], проверяющий нулевые гипотезы, согласно которым различные выборки были взяты из одного и того же распределения или из распределений с одинаковыми медианами.

Экспресс-оценка результатов с помощью диаграмм Box-and-Whisker-Plot, компактно изображающих распределение вероятностей и характеризующих плотность группировки данных, показала следующее. На разных экотонах: опушках леса, ближней (500 м от факела) ($n = 249$) и дальней по отношению к источнику загрязнения ($n = 138$), имеют место изменения производных морфологических показателей листовых пластин березы по сравнению с данными, полученными в точке удаленного контроля (фон). С наветренной стороны интерквартильный размах значений периметра листа был сужен в 1,7 раза, а его площади – в 2,2 раза по сравнению с фоновыми значениями (рис. 4, 5). Это может быть расценено как адаптационное изменение в ответ на продолжительное действие техногенного фактора. Для осины изменение интерквартильных диапазонов не было выраженным. Возможно, это является проявлением различий в степени устойчивости березы и осины к данному неблагоприятному воздействию.

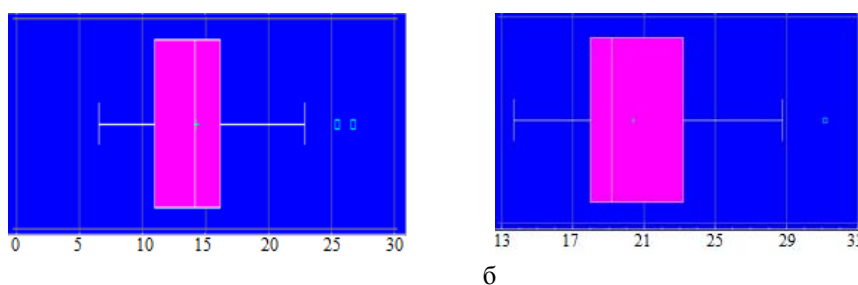


Рисунок 4. Диаграммы Box-and-Whisker-Plot. Площадь (а) и периметр (б) листовой пластины на удаленном фоне

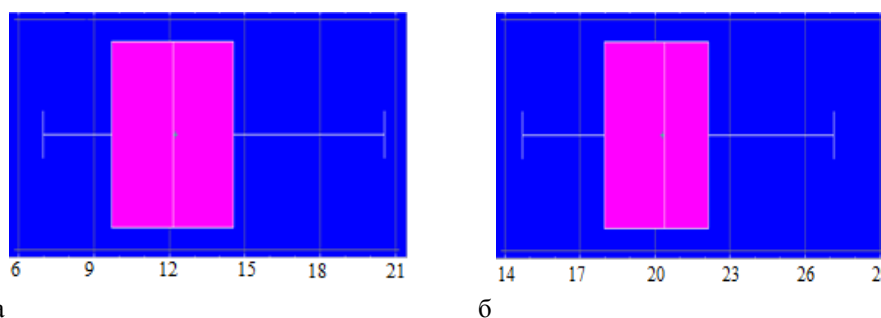


Рисунок 5. Диаграммы Box-and-Whisker-Plot. Площадь (а) и периметр (б) листовой пластины на опушке с наветренной стороны

Таблица 1. Результаты кластерного анализа площади листовой пластины березы

Кластеры	Наветренная опушка		Подветренная опушка		Фон	
	Площадь, см ²	% листьев	Площадь, см ²	% листьев	Площадь, см ²	% листьев
1	10,10	49	10,79	68	13,08	68
2	14,50	51	16,83	32	21,79	32
1	9,49	33	8,70	24	12,07	38
2	12,63	44	12,14	48	16,28	43
3	16,13	23	17,09	28	25,18	19
1	9,44	33	7,33	22	12,29	34
2	12,26	29	7,65	32	13,44	26
3	13,96	23	14,69	19	18,70	26
4	16,52	15	24,37	27	26,22	14
1	7,89	28	8,9	19	10,15	17
2	7,99	18	10,08	24	14,1	21
3	13,79	19	14,18	25	14,72	30
4	16,16	23	14,55	27	20,06	20
5	18,92	12	21,77	5	27,03	12

С помощью критерия Краскела-Уоллиса была отклонена нулевая гипотеза о том, что значения периметра и площади листовой пластины березы для исследуемых площадок взяты из одного и того же распределения. Таким образом, использование данного непараметрического критерия выявило различия изучаемых параметров на участках трансекты, удаленных на разное расстояние от факела. При проведении кластеризации решение о числе кластеров принималось на основании визуальной оценки данных и личного опыта. При разбиении на 3, 4 и 5 кластеров значения площади листа ниже контрольной (фоновой) медианы имели с наветренной стороны 85-100 % листьев березы, с подветренной – от 72 до 95% (табл. 1). При разбиении данных на 3 кластера на фоновом участке наибольшее число объектов (43%) относилось к кластеру со средним значением площади листовой пластины 16,28 см², в то время как с наветренной стороны 44% листьев относились к кластеру со средним значением 12,63 см². Это согласуется с данными литературы об уменьшении исследуемых показателей в ответ на загрязнение окружающей среды [13]. Периметр ниже фоновой медианы имели 85% листьев на ближней к факелу опушке.

Полученные результаты можно расценить как реакцию на продолжительное стрессовое воздействие, которая, возможно, направлена на оптимизацию морфологических параметров листа березы.

Список литературы / References:

1. Иванецкий Г.Р. *Выражи закономерностей*. М.: Наука, 2011, 327 с. [Ivanitskii G.R. *Turns patterns*. М.: Nauka, 2011, 327 p. (In Russ.)]
2. Бутовский Р.О. *Устойчивость комплексов почвообитающих членистоногих к антропогенным воздействиям*. М.: Изд-во День серебра, 2001, 322 с. [Butovskii R.O. *Resistance of complexes of soil-dwelling arthropods to anthropogenic influences*. М.: Izd-vo Den serebra, 2001, 322 p. (In Russ.)]
3. Коробова Н.Л., Коробова А.Н. К вопросу о целесообразности биоиндикации загрязнения атмосферы урбосистем с помощью высших растений. *Естествознание и гуманизм*, 2007, т. 4, № 4, с. 70-71. [Korobova N.L., Korobova A.N. To the question of expediency of bioindication of air pollution of urban systems by means of higher plants. *Estestvoznaniye i gumanizim*, 2007, vol. 4, no. 4, pp. 70-71. (In Russ.)]
4. Бельская Е.А., Воробейчик В.Л. Реакция филофагов осины на выбросы Среднеуральского медеплавильного завода. *Экология*, 2013, № 2. с. 99-109. [Belskaia E.A., Vorobeichik V.L. The reaction of phyllophagous aspen to emissions from the middle Ural copper smelter. *Ekologiya*, 2013, no. 2, pp. 99-109. (In Russ.)]
5. Шавнин С.А., Юсупов И.А., Артемьева Е.П., Голиков Д.Ю. Влияние повышения температуры среды на формирование наземной растительности вблизи газового факела. *ИВУЗ. Лесной журн*, 2006, № 1, с. 21-28. [Shavnin S.A., Iusupov I.A., Artemeva E.P., Golikov D.Yu. Influence of environment temperature increase on ground vegetation formation near gas flare. *IVUZ. Lesnoi zhurn*, 2006, no. 1, pp. 21-28. (In Russ.)]
6. Бухарина И.Л. Эколого-биологические особенности адаптации древесных растений в условиях усиленной техногенной нагрузки. *Принципы и способы сохранения биоразнообразия. Матер. IV Всерос. науч. конф.* Йошкар-Ола: Изд-во Мар. гос. ун-та, 2010, с. 4-7. [Bukharina I.L. Ecological and biological features of adaptation of woody plants in conditions of increased anthropogenic load. *Principles and methods of biodiversity conservation. Mater. IV Vseros. nauch. konf.* Ioshkar-Ola: Izd-vo Mar. gos. un-ta, 2010, pp. 4-7. (In Russ.)]
7. Гурова Н.Н., Гуров А.В. Изменение параметров листовой пластинки березы и активность филофагов в зоне воздействия Ачинского НПЗ. *Лесные биогеоценозы бореальной зоны: география, структура, функции, динамика. Матер. междунар. конференции*. Красноярск, Россия, 16-19 сентября 2014, с. 319-321. [Gurova N.N., Gurov A.V. The change in the parameters of the leaf blade of birch and the activity of phyllophagous in the zone of influence of Achinsk refinery. *Forest biogeocenoses of the boreal zone: geography, structure, functions, dynamics. Mater. Mezhdunar. konf.* Krasnoyarsk, Russia, 16-19 sent. 2014, pp. 319-321. (In Russ.)]

8. Kozlov M.V., Zvereva E.L., Zverev V.E. *Impacts of point polluters on terrestrial biota*. Berlin etc.: Springer, 2009, 466 p.
9. Zvereva E.L., Kozlov M.V. Responses of terrestrial arthropods to air pollution: a meta-analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2010, vol. 17, pp. 297-311.
10. Акопов А.С., Московцев А.А., Доленко С.А., Савина Г.Д. Кластерный анализ в медико-биологических исследованиях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 2013, т. 57, № 3, с. 84-96. [Akopov A.S., Moskovtsev A.A., Dolenko S.A., Savina G.D. Cluster analysis in biomedical research. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*, 2013, vol. 57, no. 3, pp. 84-96. (In Russ.)]
11. Дигурова И.И., Шипов А.А. Оценка гемореологических нарушений при экспериментальном стрессе у крыс с помощью кластерного анализа. *Вестник КрасГАУ*, 2011, № 7, с. 132-137. [Digurova I.I., Shipov A.A. Evaluation of hemorheological disorders in experimental stress in rats using cluster analysis. *Vestnik KrasGAU*, 2011, no. 7, pp. 132-137. (In Russ.)]
12. Кобзарь А.И. *Прикладная математическая статистика*. М.: Физматлит, 2006, с. 466-468. [Kobzar A.I. *Applied mathematical statistics*. M.: Fizmatlit, 2006, pp. 466-468. (In Russ.)]
13. Хузина Г.Р. Влияние урбаноcреды на морфометрические показатели листа березы повислой (*Betula pendula* Roth.). *Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле*, 2010, № 3, с. 53-57. [Khuzina G.R. Influence of urban environment on morphometric parameters of birch leaf (*Betula pendula* Roth.). *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Biologiya. Nauki o Zemle*, 2010, no. 3, pp. 53-57. (In Russ.)]

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF A CONSTANTLY ACTING TORCH OF THE ACHINSK REFINERY ON MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF BIRCH AND ASPEN LEAVES

Gurova N.N.¹, Digurova I.I.², Gusev S.D.³

¹ Siberian Federal University

Svobodnyj av., 79/10, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: nina-guro@mail.ru

² Pirogov Russian National Research Medical University

Ostrovitianov str., 1, Moscow, 117997, Russia; e-mail: digurova56@mail.ru

³ Krasnoyarsk state medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky
Partizan Zheleznyak str., 1, Krasnoyarsk, 660022, Russia; e-mail: sdg53@rambler.ru

Abstract. This article considers an approach based on the use of alternative mathematical methods to estimate the influence of the permanent gas-burning torch of the Achinsk oil refinery (AOR) on the nearby mixed aspen-birch forest. The perimeter and area of the leaf plate, as well as the fractal ratio of the first to the square root of the second, were investigated for the birch and aspen foliage located at a distance of 500 m from the torch. To provide reliable and valuable interpretations for the large data sets, our analysis employs not only their usual statistical processing but also special procedures aimed at a possible detection of hidden information. In particular results of cluster analysis and that based on the use of the Kruskal-Wallis criterion suggested that there is a response to the prolonged stress exposure, possibly aimed at optimizing of the morphometric parameters.

Key words: Achinsk refinery, torch for burning of passing gases, birch/aspen forest, morphometry of birch leaves.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2019 ГОД

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М.** Сравнительный анализ пространственной и электронной структуры трипептидных ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ).....№ 1, с. 39-45
- Астафурова М.В., Астафуров В.И.** Физико-математическое доказательство иерархической индивидуальности живых структур№ 4, с. 456-462
- Ахвердиева Г.А.** Оценка биологически активной конформации дельторфинов и построение фармакофорной модели для их взаимодействия с δ -рецепторами№ 1, с. 22-31
- Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Турабова Г.А., Багирова О.Ш.** Связывание ионов железа с меланинами растительного происхождения№ 2, с. 190-194
- Багрова О.Е., Малышко Е.В., Твердислов В.А.** Об особенностях хиральных вторичных структур, определяющих функции белков№ 4, с. 447-451
- Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., Ярошенко Н.С., Кукленко С.А.** Ассоциация рибофлавина и натриевого эфира салициловой кислоты в водном растворе№ 1, с. 32-38
- Беспалова С.В., Кладько Д.В., Легенький Ю.А., Павлов В.Н., Глазунова В.А.** Влияние низкочастотного переменного магнитного поля на жизнеспособность магнитомаркированных клеток *Saccharomyces cerevisiae*№ 3, с. 335-339
- Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Линик А.С.** Influence of phase transition of near membrane water on gravitropic reaction of plants in different combination of magnetic and electric fields.....№ 2, с. 201-208
- Вершубский А.В., Тихонов А.Н.** Математическое моделирование регуляции световых стадий окислительного фотосинтеза№ 2, с. 168-177
- Воротнов А.Д., Цареградская А.И., Лианг Л., Юдинцев А.В., Костюк А.Б., Звягин А.В.** Влияние поверхностного покрытия антистоксовых нанофосфоров на коллоидную стабильность в растворах трансферрина.....№ 3, с. 327-334
- Горбач В.И., Ермак И.М., Давыдова В.Н.** Покрытие липосом хитозаном и их мукоадгезивные свойства№ 2, с. 178-181
- Железнова С.Н., Малахов А.С., Геворгиз Р.Г.** Измерение спектра поглощения плотных культур бентосных микроводорослей.....№ 4, с. 463-466
- Замятнин А.А., Белозерская Т.А.** Размер природных линейных пептидных структур№ 3, с. 315-321
- Кальпа В.А., Лелеков А.С.** Оценка коэффициента абсорбции углерода культурой *Dunaliella viridis* Teod.№ 4, с. 490-495
- Касьяненко Н.А., Варшавский М.С., Симанов Г.С., Бакулев В.М.** Интеграция ДНК с наночастицами серебра№ 2, с. 182-189
- Королева В.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.** Исследование физико-химических и кинетических свойств бромелина в свободном и иммобилизованном состояниях.....№ 3, с. 322-326
- Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.** Влияние ультрафиолетового - В излучения на структуру плазматических мембран клеток дрожжей№ 1, с. 17-21
- Мосунов А.А., Сало В.А., Воронин Д.П., Евстигнеев М.П.** Самоассоциация фуллерена и его комплексообразование с химиотерапевтическими препаратами – перспективное противоопухолевое средство№ 4, с. 480-489
- Нечипуренко Ю.Д., Касерес Х.Л.** Концепции в молекулярной биофизике№ 4, с. 452-455
- Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е.** К вопросу о молекулярных механизмах действия магнитных условий (нулевые и комбинированные магнитные поля) на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах.....№ 2, с. 160-167

- Сажина Н.Н., Пальмина Н.П., Плащина И.Г., Антипова А.С., Семенова М.Г.** Иницированное окисление фосфатидилхолиновых липосом и изменение их физико-химических характеристик в процессе окисления № 2, с. 151-159
- Сакибаев Ф.А., Макин С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.** Анализ степени гомологии аминокислотных последовательностей гликозид-гидролаз из различных продуцентов № 3, с. 311-314
- Семенова Е.В., Малышко Е.В., Твердислов В.А.** О возможной взаимосвязи хиральности лекарственных препаратов и хиральных структур в биомакромолекулах-мишенях № 3, с. 346-351
- Сороко С.С., Юдинцев А.В., Костюк А.Б., Лермонтова С.А., Плеханов В.И., Клапшина Л.Г., Балалаева И.В., Шиягина Н.Ю.** Дозозависимое изменение вязкостных свойств опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии № 3, с. 340-345
- Суслов М.А.** Метод исследования динамики водной проводимости в корнях интактных растений кукурузы в условиях повышенной концентрации углекислого газа № 4, с. 472-479
- Чернышев Д.Н., Тренкеншу Р.П.** Модель реконструкции спектра поглощения красной области *Spirulina platensis in vivo* по характеристикам растворов хлорофилла *a* и фикобилинов № 4, с. 467-471
- Шейкина Н.В., Богатина Н.И., Линик А.С.** The threshold value of the static magnetic field induction for gravitropic reaction depends essentially on the relative direction of static magnetic field and roots of plants № 2, с. 195-200
- Яхно Т.А., Яхно В.Г.** Физико-химическая эволюция дисперсной фазы воды при ее высыхании № 1, с. 9-16

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.** Пространственная структура молекулы АСТН-(4-10)-PGP № 1, с. 57-62
- Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.** Влияние мутантных форм синаптических рецепторов NMDA на осцилляции в нейронных сетях № 2, с. 209-213
- Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Гаджиева Ш.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.** Пространственная структура молекул экзорфина А4 и А5 № 1, с. 63-67
- Батмунх М., Баярчимэг Л., Бугай А.Н., Лхагва О.** Компьютерное моделирование формирования повреждений ДНК в нервных клетках при воздействии тяжелых заряженных частиц № 2, с. 214-219
- Брильков А.В., Брилькова Е.В., Ганусов В.В., Жабрун И.В., Логинов Ю.Ю.** Экологическая биофизика: опыт математического моделирования динамики трансгенных микробных популяций № 3, с. 378-382
- Васильев М.М., Костюкова Л.О.** Анализ взаимодействия фуллерена C₆₀ с органическими растворителями методами квантовой механики № 4, с. 523-526
- Гараева А.Я., Сидорова А.Э., Твердислов В.А.** Детерминированные механизмы естественного отбора как перколяционной решетки № 3, с. 360-363
- Гараева А.Я., Сидорова А.Э., Твердислов В.А.** Соотношение самоорганизации и случайных процессов в перколяционной решетке естественного отбора № 3, с. 364-368
- Гарсон Дасгупта А.К., Свешникова А.Н.** Математическая модель образования кластеров рецепторов произвольного размера № 3, с. 374-377
- Демухамедова С.Д.** Квантовохимическое исследование комплексов двух таутомерных форм карнозина с кобальтом № 4, с. 505-513
- Дусаева Я.М., Водопьянов В.В.** Математическая модель роста злокачественной опухоли № 1, с. 68-72
- Зорин Н.М., Шевченко М.И., Москвин А.С.** Моделирование внутриклеточного механизма возникновения и подавления сердечной аритмии № 4, с. 514-522
- Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.** Структурная организация глипролиновой пентапептидной молекулы № 1, с. 51-56
- Кущенко Ю.К., Беляев А.В.** Компьютерное моделирование конформационных изменений и механической активации фактора фон Виллебранда в сдвиговом потоке вязкой жидкости № 2, с. 220-225
- Луценко А.О., Сидорова А.Э.** Количественная оценка хиральности спиральных структур белков № 3, с. 369-373

- Судоргин С.А., Заичкина М.А. Исследование термоэлектрических характеристик углеродных нанотрубок для разработки биосенсоров № 1, с. 46-50
- Твердислов В.А., Мазуров М.Е., Яковенко Л.В. О механизмах хиральности макроскопических систем № 4, с. 496-504
- Чекушкин А.А., Гаврилов П.Е., Лелеков А.С. Автоматический датчик оптической плотности культуры микроводорослей на базе Arduino Nano №3, с. 352-359

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Алексеева О.М., Кременцова А.В., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Голощанов А.Н., Ким Ю.А. Модельные мембранные объекты для исследований действия эндогенных и экзогенных факторов № 2, с. 245-252
- Апельцин В.Ф., Полетаев А.И., Трухан Э.М. Магнитный векторный потенциал как модулятор химических и биологических процессов № 4, с. 550-557
- Баранов Д.Ю., Скуратовская И.В., Рогова О.В., Мухина Ю.В., Лантушенко А.О. Анализ адаптации школьников к отдыху в детских лагерях с помощью микроядерного теста букального эпителия № 3, с. 413-416
- Васильева Т.И., Шарова Т.В., Хренова А.А., Глушников В.А., Кленова Н.А. Влияние импульсных магнитных полей на сорбционные свойства бактериальных целлюлозных пленок № 1, с. 107-113
- Веляев Ю.О., Кометиани И.Б., Булатникова Е.А. Изучение некоторых физико-химических свойств аморфного диоксида кремния, полученного из нефелина, и возможность его применения в качестве энтеросорбента № 4, с. 537-541
- Венская Е.И., Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И. Влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на модификацию мембранных белков эритроцитов человека *in vitro* № 3, с. 383-388
- Внуков В.В., Гуценко О.И., Милютин Н.П., Анания А.А., Корниенко И.В., Плотников А.А. Роль митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 в регуляции сигнальной системы KEAP1/Nrf2/ARE и апоптоза в головном мозге при окислительном стрессе № 1, с. 94-101
- Галан Трухильо Г.Д., Моралес Санчес М.А., Веласкез де ла Луз Э., Луна-Флорес А., Августин Серрано Р., Сервантес Тавера А.М., Эрнандес Сантьяго А.А. Study of photocatalytic activity with silver and copper phosphates obtained by chemical synthesis assisted by microwaves № 1, с. 81-84
- Гармаза Ю.М., Зубрицкая Г.П., Слобожанина Е.И. Спектрально-люминесцентные характеристики комплексов амилоидных структур с белками крови № 2, с. 237-244
- Генералов Е.А. Влияние полисахаридного препарата «Иммеран» на течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки № 1, с. 85-89
- Гильфанов Р.М., Черенков И.А., Сергеев В.Г., Иванова И.Л. Электрохимическое моделирование диффузии катехоламинов в гидрогелевых средах различного состава № 3, с. 389-392
- Головченко И.В., Рогова О.В., Завьялова О.С., Мирошниченко Е.В., Довгаленко В.В. Peculiarities of caffeine and caffeine sodium benzoate aqueous solution in presence of fullerene C₆₀ № 4, с. 542-545
- Де ла Роса Оропеза Д., Рейес Рамирез Л.А., Карденас Гарсиа М., Корона Моралес Дж., Сервантес Тавера А.М., Эрнандес Сантьяго А.А., Арзола Флорес Х.А. Green chemistry: Using the aqueous extract of the leaves of a Mexican oak (*Quercus rugosa*; Fagaceae) for synthesis of silver nanoparticles № 1, с. 114-119
- Ерофеев А.В., Аносов А.А., Мансфельд А.Д., Шаракшанэ А.А., Щербаков М.И. Измерение внутренней температуры тела человека методом пассивной акустической термометрии № 2, с. 270-277
- Жигачева И.В., Крикунова Н.И., Русина И.Ф., Расулов М.М. Адаптогенные свойства ревератрола № 2, с. 226-232
- Зак П.П., Петронюк Ю.С., Храмцова Е.А., Трофимова Н.Н., Мисяков А.Н., Гурьева Т.С., Дадашева О.А., Левин В.М. Акустико-микроскопическая визуализация структур глаза японского перепела *Coturnix japonica* № 2, с. 233-236
- Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Пашкевич С.Н. Термическая инактивация микроорганизмов с использованием высоких возбужденных состояний фотосенсибилизаторов № 3, с. 393-397
- Казаринов К.Д., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Чеканов А.В. Изучение действия КВЧ облучения на клетки крови человека № 2, с. 278-282

- Касьяненко Н.А., Борисова И.В., Екимов А.А.** Анализ конформационных изменений ДНК при ее взаимодействии с координационными соединениями платины, содержащими аминокислоты № 4, с. 531-536
- Клименко И.В., Лобанов А.В.** Биосовместимые супрамолекулярные системы на основе хлорина e_6 : получение, физико-химические свойства № 4, с. 546-549
- Корнеев В.Н., Шлектарёв В.А., Забелин А.В., Ланина Н.Ф., Толочко Б.П., Вазина А.А.** Инструментально-методические разработки для исследования биологических структур с использованием синхротронного излучения № 2, с. 259-269
- Мартинovich Г.Г., Мартинovich И.В., Вчерашняя А.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Черенкевич С.Н.** Антиоксидантная и противоопухолевая активность новых синтетических серосодержащих монофенолов № 2, с. 253-258
- Мегер Я.В., Лантушенко А.О., Мухина Ю.В., Яковлева Ю.А., Ельцов О.С.** Влияние структуры боковых цепей платиносодержащих соединений на их способность к ассоциации в растворе $CDCl_3$ № 4, с. 527-530
- Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.** Трифлуоперазин модулирует транспорт Na^+ в коже лягушки № 1, с. 90-93
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И.** Ингибиторы циклооксигеназы подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые хлорпромазином в макрофагах № 1, с. 73-76
- Моралес Санчес М.А., Веласкез де ла Луз Э., Галан Трухильо Г.Д., Луна-Флорес А., Августин Серрано Р., Сервантес Тавера А.М., Эрнандес Сантьяго А.А.** Microwaves-assisted chemical synthesis of silver phosphate powder, its morphological change and photocatalytic activity with sunlight № 1, с. 77-80
- Панкова С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.** Действие УФ-излучения на свободные и иммобилизованные трипсин и коллагеназу № 3, с. 405-408
- Перетягин П.В., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Бояринов Г.А., Сергиенко В.И.** Исследование локальной микрогемодинамики и окислительного метаболизма крови при длительном воздействии ингаляционного оксида азота в эксперименте № 3, с. 417-420
- Роденко Н.А., Васильева Т.И., Беляева И.А.** Возможность применения лекарственных препаратов после облучения импульсным магнитным полем высокой напряженности № 1, с. 102-106
- Слатинская О.В., Максимов Г.В.** Динамика изменения конформации свободного и внутриклеточного гемоглобина при температурном воздействии № 2, с. 283-288
- Слобожанина Е.И., Зубрицкая Г.П., Климович Н.Н., Венская Е.И., Кутько А.Г., Скоробогатова А.С., Лукьяненко Л.М., Козарезова Т.И.** Изменение показателей феррокинезики, общей антиоксидантной активности и концентрации лактоферрина в плазме крови детей с железодефицитными состояниями в процессе лечения № 3, с. 398-404
- Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Белевич Е.И., Слобожанина Е.И.** Участие металлотионеинов в поддержании жизнеспособности лейкозных лимфоцитов при модификации окислительно-восстановительного баланса № 4, с. 558-563
- Хлудеев И.И., Самцов М.П., Ляшенко Л.С., Луговский А.А.** Фотофизические свойства полиметиновых фотосенсибилизаторов в водном растворе в присутствии белков сыворотки крови № 3, с. 409-412
- Щербатюк Т.Г., Чернигина И.А., Плеханова Е.С., Гапеев А.Б.** Спонтанные и индуцированные повреждения ДНК в лейкоцитах крови крыс с карциномой почки РА при озонифотодинамическом воздействии № 4, с. 564-569

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

- Барбин Н.М., Алексеев К.С., Вершинин В.Л.** Влияние кавитационной обработки воды на рост гидробионтов № 1, с. 120-123
- Гасанова А.Е.** Modification mechanisms of electrophysiological characteristics of *Chara fragilis* cells under the influence of gamma rays and extracts of phytoprotectors № 2, с. 300-303
- Гурова Н.Н., Дигурова И.И., Гусев С.Д.** Оценка влияния постоянно действующего факела ачинского НПЗ на морфологические параметры листьев березы и осины № 4, с. 585-589

- Дорошенко Ю.В.** Кинетические характеристики роста микроорганизмов перифитона систем гидробиологической очистки.....№ 3, с. 435-439
- Завьялова О.С., Ластовенко О.Р., Лисютин В.А., Лучин В.Л., Петренко Н.В., Рогова О.В., Рыбакова К.А., Ярошенко А.А.** Лабораторный комплекс для измерения проницаемости почв виноградников.....№ 2, с. 295-299
- Завьялова О.С., Ластовенко О.Р., Лисютин В.А., Лучин В.Л., Петренко Н.В., Рогова О.В., Рыбакова К.А., Ярошенко А.А.** О воздействии скалярных и векторных компонент звукового поля на рыб и беспозвоночных№ 4, с. 577-584
- Ластовенко О.Р., Лисютин В.А.** Биологическая активность водорослей и изменчивость акустических характеристик придонного слоя вод моря.....№ 3, с. 421-427
- Лисютин В.А., Ластовенко О.Р.** Биотурбация и изменчивость акустических характеристик переходного слоя дна мелкого моря.....№ 1, с. 138-143
- Луна Флорес А., Моралес Санчес М.А., Эрнандес Сантьяго А.А., Сервантес Тавера А.М.** Synthesis of ZnO by the hydrothermal method using different precursors for the degradation of methylene blue№ 1, с. 124-127
- Молина Монтелеон С.М., Савинон Флорес М.Ф., Видал Роблес Э., Эрнандес Сантьяго А.А., Арзола Флорес Х.А.** Characterization of the composting process using machine learning algorithms№ 1, с. 128-130
- Моран Титла К.Д., Атенко Росас Х.Э., Видал Роблес Э., Муруэта Фортиз Р., Корона Моралес Дж., Эрнандес Сантьяго А.А., Арзола Флорес Х.А.** Description and statistical analysis of the SOD1 network and its correlation with its genetic properties.....№ 1, с. 131-137
- Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А.** Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциально чувствительного флуоресцентного зонда№ 3, с. 428-434
- Романенко С.А., Геворгиз Р.Г.** Конструктивные особенности портативных фотобиореакторов для микроводорослей.....№ 2, с. 289-294
- Солдатов А.А.** Активность Na^+ , K^+ -АТФазы и баланс одновалентных катионов в ядерных эритроцитах морских рыб в условиях гипосмотической нагрузки (эксперименты *in vivo*).....№ 4, с. 570-576