

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 5, № 2
2020**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 5, № 2
2020**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 5, No. 2, 2020**

Севастополь
2020

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.

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 5, № 2, 2020

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, И.А. Шаев

Молекулярные механизмы действия магнитной депривации на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами 217

Н.К. Кочарли, С.Т. ГумматоваСтруктурно-функциональное состояние плазматических мембран клеток дрожжей при действии γ – излучения 223**Н.Н. Хечинашвили, М.С. Кондратьев**

Термодинамика нативной структуры глобулярного белка 229

Д.Н. Чернышев, С.Ю. Горбунова, Р.П. ТренкеншуРазделение спектров поглощения культуры и ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* на спектры отдельных пигментов 232**А.С. Гулин, Р.П. Тренкеншу, Д.Н. Чернышев**

Декомпозиция красной области спектра поглощения – начальный метод оценки пигментного состава микроводорослей 239

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

Сравнение конформационных свойств антигипертензивных молекул овокинина (2-7) и новокинина 246

Г.А. Агаева, Г.Р. Сеферли, Н.М. Годжаев

Структурные и конформационные особенности фрагментов молекулы гиламбатина 250

А.С. Лелеков, В.С. Ключкова, А.В. ГаджиМаксимальная продуктивность накопительной культуры *Porphyridium purpureum* и *Arthrospira platensis* при различной освещённости 253

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

В.С. Быстров, С.В. Филиппов, О.А. Жулябина, В.А. Твердислов

Молекулярное моделирование структуры и свойств дифенилаланиновых пептидных нанотрубок разной хиральности, содержащих молекулы воды 261

Л.О. Костюкова, С.В. Леонтьева, Д.П. Воронин, К.А. Рыбакова,**А.С. Бучельников, В.В. Костюков**

Электронные состояния акридинового оранжевого в водном растворе 269

Б.Н. Ключков

Моделирование динамики крупных кровеносных сосудов 274

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**Э.А. Касумов, Р.Э. Касумов, И.В. Касумова**

Механизм действия препаратов ПУЛДИС энергет Р и ПУЛДИС герпофф К на энергетику и их роль в профилактике старения и возраст-зависимых болезней 278

А.Г. Погорелов, Т.А. Степанова, В.Н. Погорелова, О.А. Суворов, А.А. Гулин

Nutrition additive of E322 as phosphatidylcholine source for envelope in nanoscale formulation 286

Д.А. Смоленцева, А.Г. Миронова, А.В. Сыбачин, С.И. Афанасьева, Е.Ю. Симоненко

Модификация криопротекторной среды компонентами яичного желтка для повышения выживаемости сперматозоидов человека после криоконсервации 291

М.В. Дубинин, А.А. Семенова, В.А. Выдрина, В.А. Шарапов, А.Е. Степанова, К.С. Теньков, Е.И. Хорошавина, К.Н. Белослудцев

Тритерпеноиды лупанового ряда как модуляторы функциональной активности митохондрий печени крыс 296

А.Г. Шлихт, Н.В. Краморенко

Геном-центрированная интеллектуальная системно-кибернетическая структурированная модель в задачах оптимального синтеза рационов человека 301

А.Л. Григорьян, М.Л. Золотавина

Выбор метода определения активности ферментов разных классов в зависимости от их локализации в клетке 305

Т.А. Прокопенко, Н.И. Нечипуренко, М.Н. Коваленко, И.Д. Пашковская, М.П. Патапович, А.П. Зажогин

Оценка динамики метаболизма ЖНЭ в организме пациентов с заболеваниями головного мозга методами атомно-эмиссионной спектроскопии образцов плазмы крови 310

Г.Ф. Шаймарданова, И.А. Гайсин, А.Р. Васильева, Л.А. Краснова

Динамика экспрессии генов в поясничном утолщении спинного мозга и седалищном нерве мыши при моделировании гипогравитации 317

Ю.Г. Бирулина, Е.Е. Буйко, И.О. Габитова, В.В. Иванов, Л.В. Смаглий, А.В. Носарев, И.В. Ковалев, С.В. ГусаковаРоль Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта в регуляции сократительных реакций гладких мышц сосудов при метаболическом синдроме 321**Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, Е.В. Михлина, М.М. Симунин, И.И. Рыжков, В.С. Бондарь**

Получение композита из нановолокон оксида алюминия и наноалмазов и изучение его физико-химических свойств 326

Е.А. Храмцова, С.В. Крашенинников, Ю.С. Петронюк, Н.Н. Трофимова, Т.С. Гурьева, О.А. Дадашева, В.М. Левин, Т.Е. Григорьев, П.П. ЗакВлияние разных типов освещения на механические свойства склеры на примере японского перепела *Coturnix japonica* 331**А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина**Нейролептик трифлуоперазин подавляет стимулирующее влияние иммуномодулятора глутоксида на транспорт Na^+ в коже лягушки 335

М.Л. Золотавина

Корреляционная связь методов функциональной диагностики и биохимических методов исследования в оценке формирования патологии третьего триместра беременности 339

Д.С. Истомин, М.Л. Золотавина

Иммунохемилюминесцентный анализ как альтернатива тандемному методу ВЭЖХ-масс-спектрометрии для определения концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови 345

В.В. Крипакова, М.Л. Золотавина

Использование метода ИФА в диагностике острых кишечных инфекций, вызванных норо- и ротавирусами 349

Ю.О. Веляев, Д.В. Майоров

Исследование некоторых физико-химических свойств кремниевых сорбентов, полученных на основе нефелинового концентрата 354

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА**В.В. Дубас, И.В. Алексашкин, А.А. Мосунов, К.В. Якимова**

Спектральные исследования лугово-черноземных почв Белогорского района Республики Крым 359

CONTENTS

Volume 5, No. 2, 2020

GENERAL BIOPHYSICS

V.V. Novikov, E.V. Yablokova, I.A. Shaev

Molecular mechanisms of magnetic deprivation on the production of reactive oxygen species by neutrophils 217

N.K. Kocharli, S.T. Hummatova

Structural and functional state of the plasma membranes of yeast cells under the action of γ - radiation 223

N.N. Khechinashvili, M.S. Kondratyev

Thermodynamics of globular proteins native structure 229

D.N. Chernyshev, S.Yu. Gorbunova, R.P. Trenkenshu

Decomposition of cultural absorption spectra and the acetone extract of microalgae *Tetraselmis viridis* into spectrum of individual pigments 232

A.S. Gulin, R.P. Trenkenshu, D.N. Chernyshev

Decomposition of the red area of the absorption spectrum – the initial method of evaluating the pigmental composition of microalgae 239

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

Comparison of conformational properties of antihypertensive molecules ovokinin (2-7) and novokinin 246

G.A. Agaeva, G.R. Seferli, N.M. Godjaev

The structural and conformational particularities of fragments of hylambatin molecule 250

A.S. Lelekov, V.S. Klochkova, A.V. Gadzhi

Maximum productivity of *Porphyridium purpureum* and *Arthrospira platensis* batch culture in different light conditions 253

MODELLING IN BIOPHYSICS

V.S. Bystrov, S.V. Filippov, O.A. Zhulyabina, V.A. Tverdislov

Molecular modeling of the structure and properties of diphenylalanine peptide nanotubes of different chirality containing water molecules 261

L.O. Kostyukova, S.V. Leontyeva, D.P. Voronin, K.A. Rybakova,

A.S. Buchelnikov, V.V. Kostyukov

Electronic states of acridine orange in aqueous solution 269

B.N. Klochkov

Modeling of dynamics in large blood vessels 274

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY**E.A. Kasumov, R.E. Kasumov, I.V. Kasumova**

The mechanism of action of preparations of PULDIS energet R and PULDIS herpoff K on energy and their role in the prevention of aging and age-related diseases 278

A.G. Pogorelov, T.A. Stepanova, V.N. Pogorelova, O.A. Suvorov, A.A. Gulin

Nutrition additive of E322 as phosphatidylcholine source for envelope in nanoscale formulation 286

D. Smolenceva, A. Mironova, A. Sibachin, A.A. Grigorieva, S. Yakovenko, E.Yu. Simonenko

Modification of cryoprotective medium by egg yolk components to increase survival of human spermatozoa after cryopreservation 291

M.V. Dubinin, A.A. Semenova, V.A. Vydrina, V.A. Sharapov, A.E. Stepanova, K.S. Tenkov, E.I. Khoroshavina, K.N. Belosludtsev

Lupane triterpenoids as modulators of functional activity of rat liver mitochondria 296

A.G. Shlikht, N.V. Kramorenko

Genome-centered intelligent system-cybernetic structured model for optimal synthesis of human diets 301

A.L. Grigoryan, M.L. Zolotavina

Choice of a method for determining the activity of enzymes of different classes, depending on their localization in the cell 305

T.A. Prokopenko, N.I. Nechipurenko, M.N. Kovalenko, I.D. Pashkovskaya, M.P. Patapovich, A.P. Zajogin

Assessment of the dynamics of VNE metabolism in patients with brain diseases using atomic emission spectrometry of blood plasma samples 310

G.F. Shaymardanova, I.A. Gaysin, A.R. Vasilyeva, L.A. Krasnova

The dynamics of gene expression in the lumbar spinal cord and sciatic nerve of mice in modeling hypogravity 317

J.G. Birulina, E.E. Buyko, I.O. Gabitova, V.V. Ivanov, L.V. Smaglyi, A.V. Nosarev, I.V. Kovalev, S.V. GusakovaRole of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport in the regulation of contractile reactions of vascular smooth muscles in metabolic syndrome 321**N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, E.V. Mikhлина, M.M. Simunin, I.I. Ryzhkov, V.S. Bondar**

Production of composite from aluminum oxide nanofibers and nanodiamonds and study of its physical and chemical properties 326

E.A. Khramtsova, S.V. Krashenninnikov, Y.S. Petronyuk, N.N. Trofimova, T.S. Gurieva, O.A. Dadasheva, V.M. Levin, T.E. Grigoriev, P.P. Zak

The influence of illumination spectra on sclera physico-mechanical properties on japanese quail chick model 331

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

Neuroleptic trifluoperazine attenuates stimulatory effect of immunomodulator glutoxim on Na^+ transport in frog skin 335

M.L. Zolotavina

Correlation relationship of functional diagnostic methods and biochemical research methods in the evaluation of the formation of the third pregnancy trimester 339

D.S. Istomin, M.L. Zolotavina

Immunochemiluminescent analysis as an alternative to the tandemic HPLC-mass-spectrometry method for the determination of valproic acid 345

V.V. Kripakova, M.L. Zolotavina

Using the ELISA method in the diagnosis of acute intestinal infections caused by noro- and rotaviruses 349

Yu.O. Velyaev, D.V. Maierov

Investigation of some physical and chemical properties of nepheline concentrate based silicon sorbents 354

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

V.V. Dubas, I.V. Aleksashkin, A.A. Mosunov, K.V. Yakimova

Spectral researches of meadow black-earth soils of the Belogorsky district, Republic of Crimea 359

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ МАГНИТНОЙ ДЕПРИВАЦИИ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕЙТРОФИЛАМИ

Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А.

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

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

Поступила в редакцию: 06.07.2020

Аннотация. Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле (МП), создаваемом системой магнитных экранов (остаточное постоянное МП не более 20 нТл), приводит к существенному снижению интенсивности их люцигенин-зависимой хемилюминесценции. При увеличении постоянного МП до 1 мкТл величина этого эффекта ослабленного МП сохраняется. При дальнейшем увеличении поля до 2,5 мкТл эффект действия поля исчезает, и снова проявляется при 7 мкТл. При величине постоянного МП 44 мкТл значения интенсивности хемилюминесценции суспензии нейтрофилов уже не отличаются от контрольных. Добавка в среду для инкубации ингибитора NADPH-оксидазы, дифенилйодония, приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (геомагнитное поле). При этом, различия между группами, обусловленные действием «нулевого» поля, проявляются, как при меньших концентрациях дифенилйодония (2,5; 5; 10 мкМ), так и при больших его концентрациях (50; 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. В отличие от этого, добавка разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях – 2,4-динитрофенола, начиная с концентрации 5 мкМ и далее, вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами, которые проявлялись при более низких концентрациях этого ингибитора и в его отсутствии.

Ключевые слова: нейтрофилы, нулевое магнитное поле, супероксидный-анион радикал, хемилюминесценция, люцигенин, NADPH-оксидаза, митохондрии.

В литературе имеется ряд сообщений о снижении продукции активных форм кислорода (АФК) в гипомагнитных условиях в различных типах клеток и при различной экспозиции [1-4]. Ранее нами было показано, что 1,5 часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при магнитном экранировании в гипомагнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле менее 20 нТл) вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 [5]. В нейтрофилах имеется несколько основных систем, в которых свободные радикалы образуются в качестве основного или побочного продукта. Прежде всего, это NADPH-оксидазы, мембранные ферменты, продуцирующие супероксидный анион-радикал по реакции одноэлектронного восстановления [6]. Кроме того, важной системой продукции АФК являются митохондрии [6]. О возможном участии электрон-транспортной цепи митохондрий в механизме эффекта «нулевого» поля свидетельствует снижение продукции АФК, регистрируемое методом флуоресцентной спектроскопии, при добавке ротенона, значительно более выраженное в опытных образцах, подвергшихся действию гипомагнитных условий [7]. В данной работе для оценки радикал-продуцирующей способности нейтрофилов после действия «нулевого» поля мы применили метод активированной хемилюминесценции с использованием селективного зонда на супероксид-анион – люцигенина [8]. На этой экспериментальной модели с целью определения возможных источников продукции супероксида, реагирующих на действие гипомагнитных условий, мы применили ингибиторный анализ с использованием ингибитора NADPH-оксидазы – дифенилйодония [9] и разобщителя окисления и фосфорилирования в митохондриях – 2,4 динитрофенола [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Нейтрофилы инкубировали при $37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ в концентрации 1 млн/мл по 0,25 мл в круглодонных кюветах из полистирола (диаметром 1,2 см и длиной 5,5 см), в которых затем измерялась хемилюминесценция. Типичное время инкубации составляло 40 минут. Заданная температура поддерживалась циркуляционным термостатом.

Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле (ГМП) с постоянной составляющей ~ 44 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15-50 нТл при таком же температурном режиме, как и опытные образцы, и одновременно с ними. Опытные образцы помещались в установку для формирования гипомангнитных условий.

В опытах была использована специальная исследовательская аппаратура - установка для формирования гипомангнитных условий, которая позволяла получить высокую степень ослабления ГМП - до 10000 раз (остаточное постоянное поле не превышало 20 нТл), и существенно ослабляла переменные техногенные помехи (до единиц нТл). Эта установка детально описана нами ранее [11, 12]. Установка состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических магнитных экранов из пермаллоя (толщиной 1 мм). Определение остаточных полей внутри установки проводили прямым измерением с помощью феррозондового магнитометра Mag – 03 MS 100 (Bartington, UK). Для формирования экспериментального слабого однородного постоянного МП внутри этой установки был установлен специальный индуктор (соленоид), который мог быть подключен к источнику постоянного тока - для формирования слабого постоянного МП (ПМП) различной интенсивности (2,5; 7; 44 мкТл), используемого в ряде опытов. Размеры экспериментального участка внутри системы экранов (диаметр 20 см, длина 40 см) позволяли поместить одновременно в зону однородного слабого магнитного поля достаточное для опытов число экспериментальных образцов (не менее 6). Опыты повторяли не менее трех раз.

До начала инкубации к части образцов добавляли по отдельности различные химические добавки: ингибитор NADPH-оксидазы – хлорид дифенилйодония (Sigma, США) в различных концентрациях 2,5; 5; 10; 20; 50; 100 мкМ, предварительно растворенный в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Sigma, США); а также разобцитель окислительного фосфорилирования – 2,4-динитрофенол (Sigma, США) в различных концентрациях 1; 4; 5; 10; 20; 200 мкМ и 2 мМ, предварительно растворенный также в ДМСО. Отдельно проверяли действие самой добавки ДМСО в конечной концентрации 1×10^{-3} М, соответствующей его присутствию в пробе с содержанием 10 мкМ дифенилйодония или 20 мкМ 2,4-динитрофенола. В ряде опытов эти ингибиторы вносили в пробы не до начала инкубации, а сразу после нее, но до введения люцигенина и регистрации хемилюминесценции.

После инкубации суспензии нейтрофилов измеряли интенсивность хемилюминесценции образцов в контрольных и опытных случаях после добавки в них раствора люцигенина (Enzo Life Sciences, США) в конечной концентрации 0,35 мМ. В работе был использован хемилюминометр Lum-1200 (ООО ДИСофт, Россия). Для анализа данных хемилюминесценции применялась программа PowerGraph. Часть результатов представлена в процентах по отношению к амплитудам хемилюминесцентного ответа в контроле, принятым за 100%.

Результаты статистически обработаны с применением t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная инкубация суспензии нейтрофилов в «нулевом» магнитном поле приводит к существенному снижению интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции (приблизительно на 30%) (рис. 1). При увеличении постоянного поля до 2,5 мкТл этот эффект не проявляется, при 7 мкТл снова возникает,

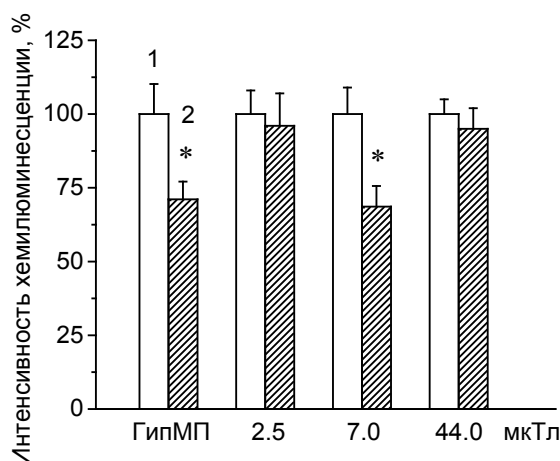


Рисунок 1. Влияние постоянного магнитного поля (ПМП) на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов

Ось ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 8$).

Ось абсцисс – величина ПМП в мкТ. «ГипоМП» соответствует ПМП не более 0,02 мкТл.

1 – контроль;

2 – опыт.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0,05$)

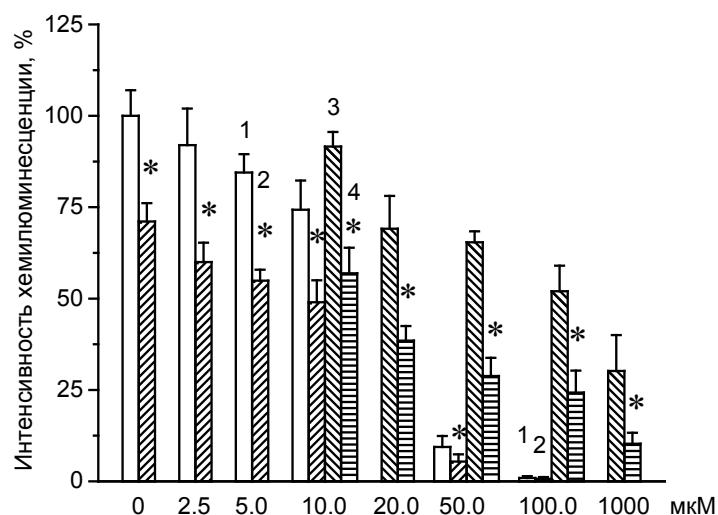


Рисунок 2. Влияние дифенилйодония на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП
 Ось ординат – максимальная интенсивность хемилюминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$).
 Ось абсцисс – концентрация дифенилйодония в мкМ.
 1 – контроль, добавка дифенилйодония перед инкубацией.
 2 – опыт, добавка дифенилйодония перед инкубацией.
 3 – контроль, добавка дифенилйодония после инкубацией.
 4 – опыт, добавка дифенилйодония после инкубаций.
 Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0,05$)

и исчезает при 44 мкТл (значение соответствует величине постоянного МП в контроле) (рис. 1). Такой мультипиковый (полиэкстремальный) характер зависимости ответа на слабое постоянное МП отмечался нами и ранее в опытах на нейтрофилах при регистрации продукции АФК методом флуоресценции [11], а также на других биологических объектах [13].

Добавка в среду для инкубации дифенилйодония приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, как в опытных, так и в контрольных образцах (Рис. 2). Эффект действия дифенилйодония приблизительно линейно зависит от его дозы (растет с увеличением концентрации), как в контрольных, так и в опытных случаях (рис. 2). При этом, различия между группами, обусловленные действием «нулевого» поля, проявляются как на меньших его концентрациях (2,5; 5; 10 мкМ), так и на больших (50; 100 мкМ), приблизительно в одинаковой степени. Отсутствие значительного действия ДМСО (различия между пробами с его добавкой в концентрации 1 мМ и соответствующими контрольными образцами не превышают 5 %), применяемого в качестве растворителя при приготовлении растворов дифенилйодония, позволяет связать обнаруженные эффекты с действием именно этого ингибитора.

При добавке дифенилйодония минуя стадию инкубации, непосредственно перед измерением хемилюминесценции, характер его влияния на контрольные и опытные образцы сохраняется, но степень выраженности его действия в зависимости от дозы снижается (рис. 2).

Качественно иной результат получен нами в опытах с разобщителем окисления и фосфорилирования – 2,4-динитрофенолом. Так, добавка этого ингибитора начиная с концентрации 5 мкМ и далее, вплоть до 200 мкМ, практически полностью нивелировала различия между контрольными и опытными образцами (рис. 3). При этом интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции суспензии нейтрофилов в контроле снижается пропорционально концентрации 2,4-динитрофенола. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что динитрофенол в определенных концентрациях способен полностью отменить эффект действия «нулевого» МП. По-видимому, наиболее вероятной причиной этого эффекта динитрофенола может являться некоторая «идентичность» механизма его действия с эффектом «нулевого» поля. Действительно, в этом случае, конкурируя за субстраты, химический агент мог бы подавить эффект физического фактора. Альтернативной гипотезой для объяснения этого действия динитрофенола является предположение о том, что для реализации эффекта «нулевого» магнитного поля необходимо сопряжение окисления и фосфорилирования в митохондриях нейтрофилов, то есть необходим определенный уровень продукции АТФ. Однако опыты с добавкой динитрофенола не вначале, а после инкубации в «нулевом» поле, показавшие, что и в этом случае результат его действия также проявляется и качественно не меняется (рис. 3), скорее свидетельствуют в пользу первого предположения.

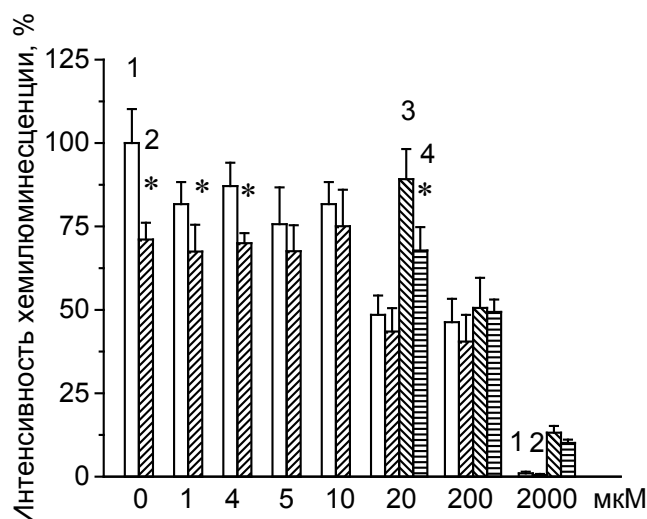


Рисунок 3. Влияние динитрофенола на интенсивность люцигенин-зависимой хемилуминесценции суспензии нейтрофилов после действия «нулевого» МП

Ось ординат – максимальная интенсивность хемилуминесценции в процентах по отношению к контролю (средние значения и стандартные отклонения, $n = 6$).

Ось абсцисс – концентрация динитрофенола в мкМ.

1 – контроль, добавка динитрофенола перед инкубацией.

2 – опыт, добавка динитрофенола перед инкубацией.

3 – контроль, добавка динитрофенола после инкубацией.

4 – опыт, добавка динитрофенола после инкубацией.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от контроля ($P < 0,05$)

Известно, что механизм действия динитрофенола, который является хорошо охарактеризованным разобщителем митохондриального дыхания, связан с его способностью рассеивать протонный градиент, возникающий благодаря транспорту электронов [10]. Рассеивание этого протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране позволяет дыханию продолжаться, но при этом прекращается синтез АТФ, который обычно черпает энергию в этом протонном градиенте. Это разобщение нарушает мембранный потенциал внутренней митохондриальной мембраны [10].

Люцигенин считается селективным зондом на САР [8], поэтому его активно используют для изучения продукции АФК как NADPH-оксидазой, так и митохондриями [14]. Характер ингибирующего эффекта дифенилйодония (неспецифический ингибитор NADPH-оксидазы), обнаруженный нами в настоящей работе на нейтрофилах, подвергшихся действию «нулевого» поля, делает сомнительным предположение о том, что NADPH-оксидаза является основным источником САР, реагирующим на действие гипомангнитных условий. Напротив, опыты с динитрофенолом, разобщителем окислительного фосфорилирования, показавшие практически полную отмену эффекта действия «нулевого» магнитного поля в его присутствии, делают обоснованным предположение, что именно митохондрии, как продуценты САР, являются основной мишенью действия этого физического фактора. Важно отметить, что это отличает эффект «нулевого» и ослабленного магнитного поля от эффектов комбинированных магнитных полей, с определенными параметрами [15], в основе которых обнаруживается влияние на регуляторные кальций-зависимые механизмы [16], контролирующие респираторный взрыв в нейтрофилах.

Список литературы / References:

1. Zhang H., Zhang Z., Mo W. et al. Shielding of the geomagnetic field reduces hydrogen peroxide production in human neuroblastoma cell and inhibits the activity of CuZn superoxide dismutase. *Protein Cell*, 2017, vol. 8 (7), pp. 527-537.
2. Martino C.F., Castello P.R. Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6(8), e22753.
3. Poltanski P., Rajkowska E., Brodecki M. et al. Combined effect of X-ray radiation and static magnetic fields on reactive oxygen species in rat lymphocytes in vitro. *Bioelectromagnetics*, 2013, vol. 34, pp. 333-336.
4. Binhi V.N., Prato F.S. Biological effects of the hypomagnetic field: Analytical review of experiments and theories. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12 (6), p. e0179340.
5. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 3, с. 484-488. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of a “zero” magnetic field on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics (Moscow)*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 365-368. (In Russ.)]

6. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, 2009, т. 49, с. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Usp. Biol. Himii*, 2009, vol. 49, pp. 341-388. (In Russ.)]
7. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Валеева Э.Р., Фесенко Е.Е. К вопросу о молекулярных механизмах действия «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 4, с. 720-725. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Galeeva E.R., Fesenko E.E. On the molecular mechanisms of the effect of a zero magnetic field on the production of reactive oxygen species in inactivated neutrophils. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 371-375. (In Russ.)]
8. Aasen T.B., Bolann B., Glette J., Ulvik R.J., Schreiner A. Lucigenin-dependent chemiluminescence in mononuclear phagocytes. Role of superoxide anion. *Scand J Clin Lab Invest*, 1987, vol. 47, pp. 673-679.
9. Cross A.R., Jones O.T. The effect of the inhibitor diphenyleneiodonium on the superoxide-generating system of neutrophils: specific labeling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J*, 1986, vol. 237, pp. 111-116.
10. El-Guindy M.M., Neder A.C., Gomes C.B. 2,4-Dinitrophenol - mechanism of action. *Cell Mol Biol*, 1981, vol. 27, pp. 399-402.
11. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А., Фесенко Е.Е. Влияние слабого постоянного магнитного поля в диапазоне величин от «нулевого» поля (0,01 мкТл) до 100 мкТл на продукцию активных форм кислорода в неактивированных нейтрофилах. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 2, с. 524-529. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A., Fesenko E.E. The effect of a weak static magnetic field in the range of magnitudes from a “Zero” Field (0.01 μ T) to 100 μ T on the production of reactive oxygen species in nonactivated neutrophils. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 443-447. (In Russ.)]
12. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Снижение интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах после воздействия определенных режимов слабых комбинированных магнитных полей. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 1, с. 97-103. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. A decrease of the respiratory burst in neutrophils after exposure to weak combined magnetic fields of a certain duration. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 82-87. (In Russ.)]
13. Новиков В.В., Шейман И.М., Фесенко Е.Е. Действие слабого и сверхслабого постоянного магнитного поля на интенсивность бесполого размножения планарий *Dugesia tigrina*. *Биофизика*, 2007, т. 52, № 5, с. 912-915. [Novikov V.V., Sheiman I.M., Fesenko E.E. Multimodal effects of nearly complete geomagnetic field deprivation on fission of the planarian *Dugesia tigrina*. *Biophysics*, 2007, vol. 52, no. 5, p. 498. (In Russ.)]
14. Джатдоева А.А., Проскурина Е.В., Нестерова А.М. и др. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах. *Биологические мембраны*, 2017, т. 34, № 6, с. 116-123. [Dzhatdоеva A.A., Proskurnina E.V., Nesterova A.M. Mitochondria as a Source of Superoxide Anion Radical in Human Platelets. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series A: *Membrane and Cell Biology*, 2018, vol. 12, pp. 43-49. (In Russ.)]
15. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Праймирование респираторного взрыва у нейтрофилов *in vitro* при действии слабых комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 3, с. 510-515. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Priming of the respiratory burst in neutrophils exposed to a combination of weak constant and alternating low-frequency magnetic fields *in vitro*. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 429-434. (In Russ.)]
16. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Новикова Н.И., Фесенко Е.Е. Влияние различных химических агентов на прайминг нейтрофилов в слабых комбинированных магнитных полях. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 2, с. 290-295. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Novikova N.I., Fesenko E.E. The effects of various chemical agents on priming of neutrophils exposed to weak combined magnetic fields. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 209-213. (In Russ.)]

MOLECULAR MECHANISMS OF MAGNETIC DEPRIVATION ON THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY NEUTROPHILS

Novikov V.V., Yablokova E.V., Shaev I.A.

Institute of Cell Biophysics RAS

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

Abstract. Preincubation of neutrophil suspension when exposed to near null magnetic field created by a system of magnetic shields (the residual static magnetic field not greater than 20 nT) is associated with a significant decrease in the intensity of lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils. The effect of weak magnetic field persists while increasing static magnetic field up to 1 μ T. This effect disappears when the level of exposure increases further up to 2.5 μ T and appears again in the range of 7 μ T. Then, when static magnetic field is 44 μ T in magnitude, the values of the chemiluminescence intensity of neutrophils do not really differ from a control. Addition of the NADPH-oxidase inhibitor diphenyliodonium to the incubation medium caused attenuation in the chemiluminescence activity both in the exposed and control samples (geomagnetic field). Differences induced by near null magnetic field were observed almost to the same extent between exposed and control samples at both lower (2.5; 5; 10 μ M), and higher (50; 100 μ M) concentrations of diphenyliodonium. In contrast, the presence of 2,4-dinitrophenol, the uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria, at concentrations of 5 μ M up to 200 μ M virtually completely blunted differences which were observed between exposed and control samples at lower concentrations of this inhibitor or in the absence of it.

Key words: neutrophils, near null magnetic field, superoxide anion radical, chemiluminescence, lucigenin, NADPH-oxidase, mitochondria

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ γ – ИЗЛУЧЕНИЯ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 07.07.2020

Аннотация. Целью работы является изучение влияния γ -лучей на клетки дрожжей путем регистрации изменений параметров флуоресценции пирена в мембранах. С использованием метода флуоресцентных зондов проведена оценка микровязкости мембран клеток дрожжей при действии γ -облучения в дозе 5-150 Гр. По данным спектров флуоресценции пирена определяли микровязкость липидного бислоя и зон белок-липидных контактов. Показано, что различные дозы по-разному изменяют такие физические параметры мембраны как микровязкость и полярность липидного бислоя. Согласно полученным результатам, показано, что после облучения клеток дрожжей изменение вязкостных характеристик мембран являются отражением адаптационных структурно-функциональных перестроек. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что процессы адаптации при большой дозе облучения (75-100 Гр) клеток дрожжей, очевидно, завершаются в более ранние сроки.

Ключевые слова: микровязкость, клетки дрожжей, γ -излучение, пирен, полярность

ВВЕДЕНИЕ

Биологическим мембранам отводиться любая из основных функций которой является для клетки жизненно необходимой (барьерная, транспортная, рецепторно-сигнальная, регуляторно-ферментативная). По мере увеличения дозы γ -излучения наблюдается подавление механизмов активного и пассивного транспорта, нарушается проницаемость ионов калия. Любой вид ионизирующего излучения приводит к широкому спектру биологических изменений в организме. Основным свойством γ -лучей является их способность разрушать слаженность биологических реакций, их взаимосвязь, порядок, повреждать регуляторные функции системы [18]. По мере усложнения биологической организации γ -лучи способствуют образованию и действию активных радикалов воды и липидов, радиотоксинов, усилению автолитических процессов, нарушению клеточной и нейрогуморальной систем регуляции [8, 12, 17]. Таким образом, результатом действия ионизирующих излучений могут быть как функциональные, так генетически значимые события в клетке [14, 19].

Показано, что различные дозы и характер облучения (хроническое или острое) по-разному изменяют такие физические параметры мембраны как микровязкость и полярность липидного бислоя [3, 9].

Некоторыми авторами основываясь на результатах, полученных в модельных мембранных системах, показано, что развитие постлучевых изменений в мембранах эритроцитов организмов, облученных в малых дозах и с низкой мощностью происходит вследствие нарушения белок-белковых, белок-липидных и липид-липидных взаимодействий. Известно, что для оценки изменений подвижности элементов мембранной структуры как липидов, так и белков, можно использовать такой интегральный показатель, как вязкость [4, 11].

Булановой Е.Б. с соавторами, был проведен широкий комплекс биохимических и биофизических исследований клеток органов животных (мышей), подвергнутых γ -облучению (^{137}Cs) низкой интенсивности [4, 6]. В отличие от структурных характеристик ДНК (адсорбция) микровязкость обеих фаз мембран на нитроцеллюлозных фильтрах значительно отличается от контроля в интервале доз 6-9,6 сГр [18]. Обращает на себя внимание сравнимый масштаб синхронных структурных сдвигов, происходящих в ДНК и мембранах под влиянием столь малых доз излучения низкой интенсивности. Предлагаемое авторами объяснение природы нелинейной бимодальной зависимости эффекта от дозы основывается на представлениях о том, что существует разрыв между дозами, вызывающими повреждения в биообъектах и иницирующими системы их восстановления. В связи с этим пока системы восстановления (или адаптации) не работают с полной интенсивностью, биоэффект нарастает с увеличением дозы [4, 12].

Таким образом, для воздействия физических факторов, а именно низкоинтенсивного ионизирующего излучения характерны закономерности: нелинейная, немонотонная, бимодальная зависимость эффекта от дозы, наличие «мертвой зоны», изменение чувствительности к действию эндогенных и экзогенных факторов, обратная зависимость от интенсивности облучения [2, 5]. Выявлено, что воздействие γ -излучения и пучков ускоренных альфа-частиц на эритроциты человека в диапазоне доз выше величины ~ 1 кГр приводит к гибели облученных клеток непосредственно сразу после облучения [15, 16]. Показано количество центров повреждения в биологической мембране при действии γ -излучения в малых дозах. При воздействии γ -излучения в малых дозах (1-35 Р) на суспензию эритроцитов наблюдается зона нестабильности биологического отклика [1]. В литературе имеются данные, посвященные механизмам радиорезистентности жизнеспособности и способности колониеобразования у дрожжей [6, 19].

То есть биота на нашей планете использует малые дозы радиации и нуждается в них [14]. Этот вывод, с одной стороны, хорошо согласуется с многочисленными работами, показавшими, что γ -облучение в небольших

дозах стимулирует развитие растений [12, 19], а с другой – находится в противоречии с общепринятым положением в радиобиологии о вредности любой дозы радиации для биоты.

Существенная роль в регуляции процессов, происходящих в мембранах, принадлежит их микровязкости комплексному показателю, который отражает как структурные, так и функциональные (диффузионные) аспекты липидной составляющей мембраны. Изменения микровязкости мембраны тесно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в клетке [4, 7].

Настоящая работа посвящена изучению влияния гамма лучей на клетки дрожжей путем регистрации изменений параметров флуоресценции пирена в мембранах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Клетки дрожжей выращивали на сусло-агаре, в термостате при температуре 28°C. Опыты проводили с суспензией 3-х дневной культуры (1×10^8 кл/мл). Облучение клеток дрожжей осуществляли γ -квантами на установке ^{60}Co . Доза облучения составляла 5Гр-150Гр.

1 мл суспензии, выравненной по содержанию белка помещали на магнитную мешалку и добавляли 10^{-3} М раствор пирена в этаноле: 0,001мл в суспензию клеток. Через 1 мин (время полного растворения пирена в липидной фазе мембран) измеряли флуоресценцию проб на спектрофлуориметре при максимуме волны возбуждающего света 334 нм для оценки микровязкости липидного бислоя. Пик флуоресценции эксимера пирена F_{Σ} регистрировали при длине волны эмиссии 470 нм, а пик флуоресценции мономера F_m при длине волны эмиссии 393 нм.

Коэффициент эксимеризации пирена F_{Σ}/F_m (334) отражающий микровязкость липидного бислоя, выражали отношением величины максимума флуоресценции эксимеров пирена F_{Σ} (в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 470$ нм) к величине максимума флуоресценции мономеров пирена F_m $\lambda_{\text{эмиссии}} = 393$ нм) при λ возбуждения 334 нм. Коэффициент эксимеризации пирена F_{Σ}/F_m (282), отражающий микровязкость зон белок-липидных контактов, также выражали отношением величины максимума флуоресценции эксимеров пирена (в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 470$ нм) и мономеров пирена в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 393$ нм) при λ возбуждения 334 нм. Отношение интенсивности флуоресценции эксимеров к мономерам F_{Σ}/F_m обратно пропорционально микровязкости липидного бислоя и прямо пропорционально его текучести.

Полярность липидной фазы мембран ($F_{372}/F_{393}(334)$) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм F_m пирена при длине волны возбуждения 334 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм. Полярность зон белок-липидных контактов ($F_{372}/F_{393}(282)$) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм F_m пирена при длине волны возбуждения 282 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм [5].

В настоящей работе изучено влияние γ -облучения на развитие процессов ПОЛ в клетках *Candida guilliermondii*. О скорости перекисного фотоокисления липидов в мембранах судили по накоплению одного из продуктов окисления малонового диальдегида (МДА), концентрацию которого определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК «Sigma»), измеряя оптическую плотность комплекса МДА-ТБК в максимуме спектра его поглощения при 532 нм ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Масло зародышей пшеницы использовали в концентрации 20 нл на 10^8 кл/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия студента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

γ -облучение клеток дрожжей в дозе 5-50 Гр судя по коэффициенту эксимеризации, приводила к увеличению микровязкости (уменьшению текучести) общего липидного бислоя мембран. Аналогичные процессы отмечались также в областях аннулярных (при белковых) липидов (рис. 1). После облучения в дозе 50-150 Гр также наблюдалось изменение параметров, характеризующих физическое состояние липидного бислоя и аннулярных липидов мембран клеток дрожжей.

Данные полученные при использовании флуоресцентного зонда пирена свидетельствует об изменении исследуемых параметров структурного состояния клеточных мембран. На основании данных об изменении микровязкости мембран дрожжей после облучения можно предположить, что модификация структуры может привести к изменению полярности липидного бислоя проницаемости.

Полярность окружения зонда пирена в липидном слое мембран $F_{372}/F_{393}(334)$ увеличивается при облучение клеток дозой 5-50 Гр (рис 2.).

При оценке полярности общего мембранного липидного бислоя установлено, что при облучении в дозе 75-150 Гр наблюдалось незначительное уменьшение полярности липидного компонента мембран клеток. Полярность окружения зонда пирена в области аннулярных липидов $F_{372}/F_{393}(282)$ не имеет существенных отличий от контроля при дозах облучения клеток от 5 до 50 Гр. Динамика полярности микроокружения пирена в мембранах клеток дрожжей имеет лишь тенденцию к снижению в участках аннулярных липидов после облучения дозой 75-150 Гр. В липидном слое мембраны полярность несколько возрастает, что согласуется с данными о

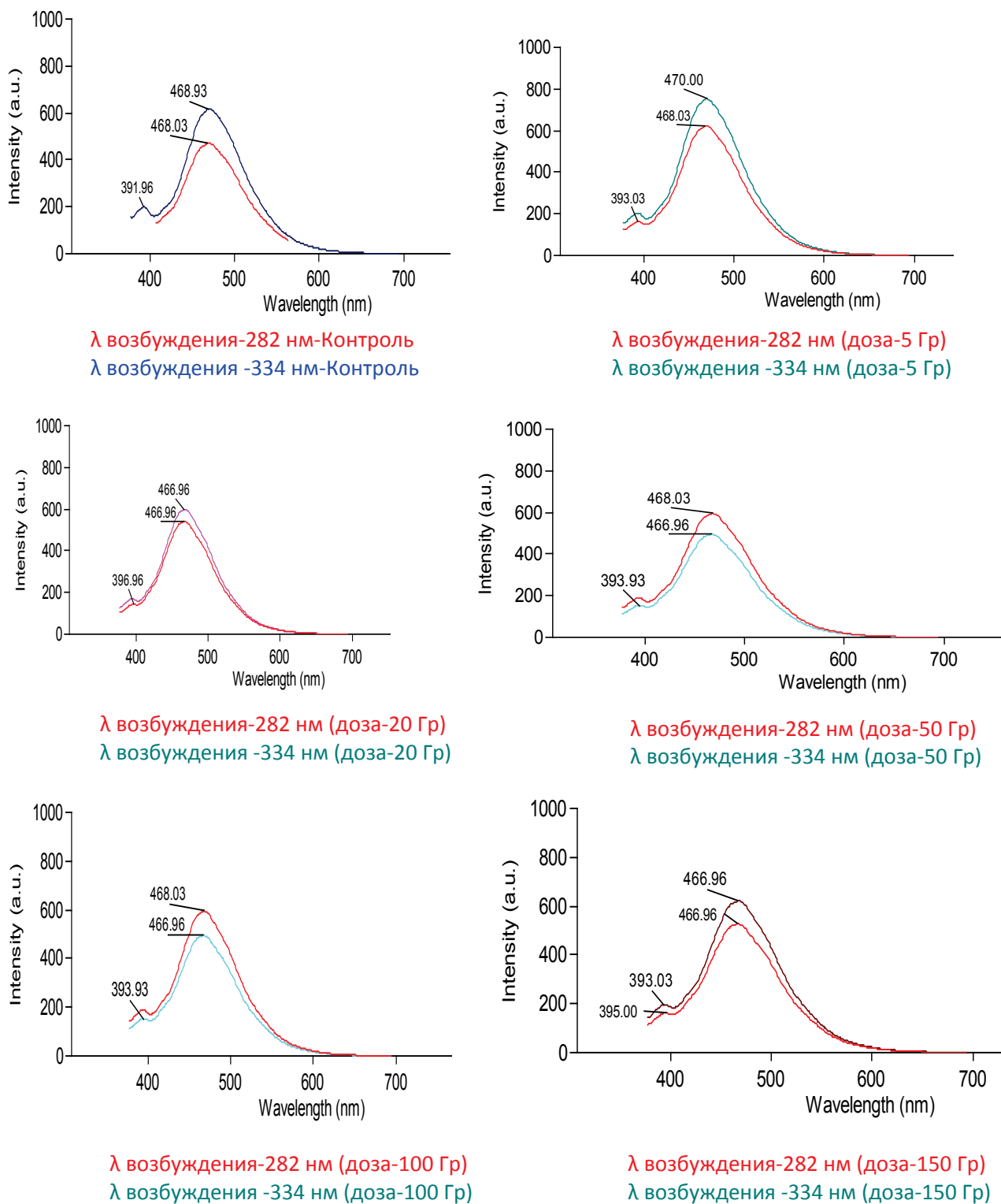


Рисунок 1. Изменение микровязкости липидного бислоя и зон белок-липидных контактов плазматических мембран клеток дрожжей от дозы γ -излучения

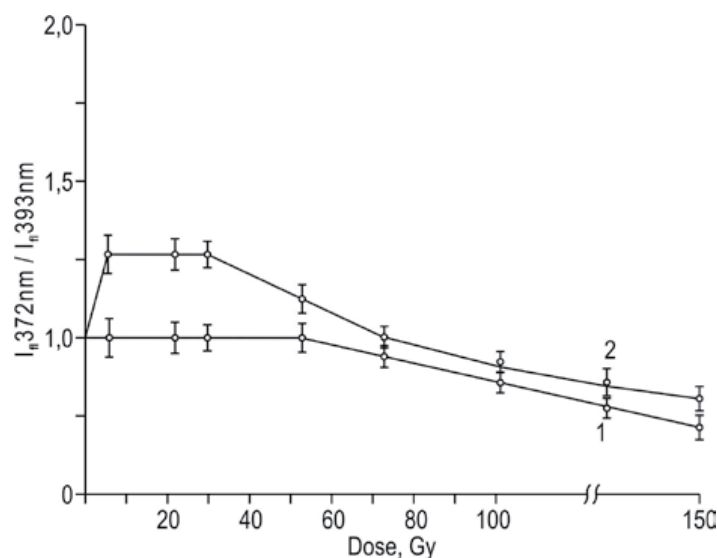


Рисунок 2. Изменение полярности липидного бислоя и зон белок-липидных контактов от дозы γ -излучения. 1) 282 нм; 2) 334 нм

накоплении в мембранах клеток первичных продуктов ПОЛ. Последствия повреждений компонентов мембран, вызванных γ -облучением вызывает необходимость более глубокого изучения влияния γ - облучения на процессы ПОЛ биомембран.

Именно на уровне дрожжевой клетки вопросы, связанные с регуляцией ПОЛ наименее изучены по сравнению с другими организмами, в то время как клеточные регуляторные механизмы у микроорганизмов играют существенно большую роль.

Установлена зависимость количества МДА образованного в клетках дрожжей от дозы γ - облучения. Показано, что с ростом дозы γ - облучения (5-150 Гр) в мембранах клеток происходит увеличение концентрации МДА, что свидетельствует о развитии процесса ПОЛ. Концентрация МДА была наибольшей при облучении клеток, в дозе 75 Гр которая превышала контрольные значения в 2 раза.

При стимуляции ПОЛ в мембранах уменьшается содержание липидов, также меняется микровязкость и электростатический заряд. При более глубоком окислении фосфолипидов нарушается структура липидного бислоя и появляются дефектные зоны в мембранах клеток, а это нарушает функциональную активность [7].

Как известно, изменение вязкостных характеристик является отражением различных модификаций межмолекулярных связей, которые, по сути, определяются сочетанием уровней подвижных и стабильных взаимодействий компонентов мембран, что вытекает из представлений о мембранной структуре, основанных на двух гипотетических моделях: жидко-мозаичной [9] и твердо-каркасной [11]. В одной из них подчеркиваются динамические аспекты организации мембран, в другой – на первый план выходит стабильность ее компонентов и межмолекулярных связей.

Таким образом, можно полагать, что при облучении клеток дрожжей в дозе 75-100 вязкостные характеристики мембран незначительно отличаются от контроля, что указывает на установление относительной стабильности структуры и функции мембран.

После облучения в дозах 5-50 Гр изменение вязкостных характеристик, уменьшение текучести липидного компонента, повидимому являются отражением адапционных структурно функциональных перестроек.

Из полученных данных, об особенностях влияния масла зародышей пшеницы во время γ -облучения следует, что модификация мембраны клеток вызванной малыми дозами носит обратимый характер и не имеет отличий от контроля как липидного бислоя и липидной фазы в при белковой области мембран клеток дрожжей. Так, после воздействия γ - облучения в дозе 75-100 Гр отмечались сходные эффекты - при облучении в присутствии масла зародышей пшеницы, вязкость липидного бислоя и белок-липидных контактов мембран клеток дрожжей в норме. Полученные нами данные, свидетельствуют о радиозащитном действии масла зародышей пшеницы.

Живая клетка наделена сложными, и в тоже время очень тонкими метаболическими механизмами и не может продолжать свою деятельность в случае даже небольшого повреждения. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что процессы адаптации при большой дозе облучения клеток дрожжей, очевидно, завершаются в более ранние сроки.

Список литературы / References:

1. Алексеева П.Ю. Исследование воздействия ионизирующих излучений и химфармпрепаратов на биологические мембраны. *Автореферат дис. кандидата биологических наук*, Москва, 2007, 28 с. [Alekseeva P.Ju. Issledovanie vozdejstviya ionizirujushhih izluchenij i himfarmpreparatov na biologicheskie membrany. *Avtoreferat dis. kandidata biologicheskikh nauk*, Moskva, 2007, 28 p. (In Russ.)]

2. Бурлакова Е.Б. Биологические эффекты действия малых доз ионизирующего излучения на клеточные мембраны: Лекции Школы по радиационной биологии в «Галактике» / Под ред. А.С. Саенко. Обнинск, 2003, с. 40-53. [Burlakova E.B. Biologicheskie jeffekty dejstvija malyh doz ionizirujushhego izlucheniya na kletochnye membrany: Lekcii Shkoly po radiacionnoj biologii v «Galaktike» / Pod red. A.S. Saenko. Obninsk, 2003, pp. 40-53. (In Russ.)]
3. Бурлакова Е.Б., Хохлов А.П. *Биол. мембраны*, 1985, т. 2, № 6, с. 557-565. [Burlakova E.B., Hohlov A.P. *Biol. membrany*, 1985, vol. 2, no. 6, pp. 557-565. (In Russ.)]
4. Буланова К.Я., Лобанок Л.М., Бокуть С.Б., Милевич Т.И. Особенности изменений структурной организации мембран эритроцитов и молекул гемоглобина в зависимости от мощности и величины дозы γ -облучения. *Экологический вестник*, 2015, № 2 (32), с.40-46. [Bulanova K.Ja., Lobanok L.M., Bokut' S.B., Milevich T.I. Osobennosti izmenenij strukturnoj organizacii membran jericitocitov i molekul gemoglobina v zavisimosti ot moshhnosti i velichiny dozy γ -obluchenija. *Jekologicheskij vestnik*, 2015, № 2 (32), pp. 40-46. (In Russ.)]
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. 1980, 320 с. [Vladimirov Ju.A., Dobrecov G.E. *Fluorescentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membran*. 1980, 320 p. (In Russ.)]
6. Гусаревич Н.Б., Богдан А.Ц. *Биологические эффекты малых доз и радиоактивное загрязнение среды (радиоэкологические и медикобиологические последствия)*. Минск, 1998, 62 с. [Gusarevich N.B., Bogdan A.C. *Biologicheskie jeffekty malyh doz i radioaktivnoe zagrijazne-nie sredy (radiojekologicheskie i medikobiologicheskie posledstvija)*. Minsk, 1998, 62 p. (In Russ.)]
7. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследования клеток, мембран и липопротеинов*. М. Наука, 1989, 276 с. [Dobrecov G.E. *Fluorescentnye zondy v issledovanija kletok, membran i lipoproteinov*. M. Nauka, 1989, 276 p. (In Russ.)]
8. Журавская А.Н. Биологические эффекты малых доз ионизирующих излучений (обзор). Физико-химическая биология. *Наука и Образование*, 2016, № 2, с. 94-102. [Zhuravskaja A.N. Biologicheskie jeffekty malyh doz ionizirujushhij izluchenij (obzor). Fiziko-himicheskaja biologija. *Nauka i Obrazovanie*, 2016, № 2, pp. 94-102. (In Russ.)]
9. Конев С.В., Аксентев С.Л., Черницкий Е.А. *Кооперативные переходы белков в клетке*. Минск: Наука и техника, 1970, 200 с. [Konev S.V., Aksencev S.L., Chernickij E.A. *Kooperativnye perehody belkov v kletke*. Minsk: Nauka i tehnika, 1970, 200 p. (In Russ.)]
10. Смотровая М.А., Круглякова К.Е., Шишкина Л.Н. и др. Структурные и биохимические показатели элементов крови мышей после гамма-облучения в малых дозах разной интенсивности. *Радиационная биология*, 1996, т. 36, № 1, с. 21-29. [Smotrjaeva M.A., Krugljakova K.E., Shishkina L.N. et al. Strukturnye i biohimicheskie pokazateli jelementov krovi myshej posle gamma-obluchenija v malyh dozah raznoj intensivnosti. *Radiac. biologija. Radiojekologija*, 1996, vol. 36, no. 1, c. 21-29. (In Russ.)]
11. Сунгуров А.Ю. *Радиобиология клеточной поверхности*. "Итоги науки и техники", ВИНТИ, сер. "Радиационная биология", 1988, т. 7, 179 с. [Sungurov A.Ju. *Radiobiologija kletочноj poverhnosti*. "Itogi nauki i tehniki", VINITI, ser. "Radiacionnaja biologija", 1988, vol. 7, 179 p. (In Russ.)]
12. Luchkey T.D. *Hormesis with Ionizing Radiation*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1980, 169 p.
13. Kuřec M., et al. Yeast vitality determination based on intercellular NAD(P)H fluorescence measurement during Aerobic-Anarobic transition. *Fol. Microb.*, 2009, vol. 5, no. 1, pp. 25-29.
14. Kudryasheva N.S., Petrova A.S., Dementjev D.V., Bondar A.A. Exposure of luminous marine bacteria to low-dose gamma-radiation. *J Environ Radioact.*, 2017, vol. 169-170 p. 64-69. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2017.01.002. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28086187.
15. Lee S.W., Ducoff H.S. The effect of ionizing radiation on avian erythrocytes. *Radiat. Res.*, 1994, vol. 137, no. 1, pp. 104-110.
16. Puchala M., Szweda-Lewandowska Z., Kiefer J. The influence of radiation quality on radiation-induced hemolysis and hemoglobin oxidation of human erythrocytes. *J. Radiat. Res.*, 2004, vol. 45, pp. 275-279.
17. Raza S., Iqbal Y., Ullah I., Mubarak M.S., Hameed M.U., Raza M. Effects of gamma irradiation on the physico-chemical and biological properties of levofloxacin. *Pak J Pharm Sci.*, 2018, vol. 31, no. 1, pp. 181-186.
18. Stark G. The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, vol. 1071, pp. 103-122, DOI: 10.1016/0304-4157(91)90020-W.
19. Sreedhar M., Anurag Chaturvedi, Aparna M., Pavan Kumar D., Singhal R.K. Influence of γ -radiation stress on scavenging enzyme activity and cell ultrastructure in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Advances in Applied Science Research*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 35-44.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE PLASMA MEMBRANES OF YEAST CELLS UNDER THE ACTION OF γ - RADIATION

Kocharli N.K., Hummatova S.T.

Baku State University,

Z. Khalilov 23, str., Baku, AZ1148, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Abstract. The aim of this work is to study the influence of γ - rays on yeast cells by recording changes in the parameters of fluorescence of pyrene in membranes. By using the method of fluorescent zonde was carried out the estimation of microviscosities of membranes in yeast cells under the influence of γ -irradiation at dose 5-150 Gy. According to the spectra of pyrene fluorescence has been determined the microviscosity of lipid bilayer and zones of protein-lipid contacts. It was shown that different doses differently change such physical parameters of the membrane as microviscosity and polarity of the lipid bilayer. Based on data, it was shown that, after the irradiation of yeast cells, the change of viscosity is a reflection of adaptive structural-functional rearrangements. The totality of the obtained data suggests that, adaptation processes at high radiation dose (75-100 Gy.) in yeast cells, obviously, end at an earlier time.

Key words: *microviscosity, yeast cells, γ -radiation, pyrene, polarity.*

ТЕРМОДИНАМИКА НАТИВНОЙ СТРУКТУРЫ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА

Хечинашвили Н.Н., Кондратьев М.С.

Институт биофизики клетки РАН

г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: nikolay@icb.psn.ru

Поступила в редакцию: 08.07.2020

Аннотация. Проведен анализ температурной зависимости теплоемкости нативной структуры глобулярных белков в водном растворе. Показано, что эта зависимость линейна. Это обусловлено составляющими вкладами вибрационной и конформационной теплоемкости и свидетельствует об отсутствии фазовых переходов второго рода вплоть до начала основного конформационного перехода. Макромолекула белка имеет двухуровневую организацию пространственной структуры. Внутренняя область белка представляет собой «ядро», ответственное за устойчивость глобулярной структуры. Боковые радикалы аминокислотных остатков поверхностного слоя динамичны и составляют основу биологической функции белка.

Ключевые слова: энергия связей, энтропия, свободная энергия.

Введение.

Абсолютная свободная энергия Гиббса является фундаментальным параметром, характеризующим нативное состояние глобулярных белков в водной среде. Последнее представляется важным фактором для формирования трехмерной структуры глобулярного белка и определяет термодинамическое поведение белка [1-3]. Знание численного значения энергии Гиббса важно для понимания пределов стабильности трехмерной структуры и представляется необходимым для анализа биохимических реакций при выполнении белками множества функционально важных задач. К числу таких задач относятся связывание лигандов белками, белок-белковых и белок-ДНК взаимодействий. В предыдущей работе [4] нами предложен подход для оценки численных значений термодинамических параметров – абсолютной свободной энергии и энтропии, характеризующих нативную конформацию глобулярных белков в водном окружении. Он основан на знании энергии слабых внутримолекулярных взаимодействий, полученной с помощью анализа процесса температурно-индуцированного разворачивания в водной среде и полуэмпирических расчетов. Наиболее ответственным моментом в предлагаемом подходе являлось утверждение, что с процессом прогрева нативного белка в растворе ее свободная энергия убывает и становится близка нулю в пред-переходном состоянии. В настоящей работе приведены термодинамические свойства прогреваемого раствора нативного белка, касающихся температурной зависимости парциальной теплоемкости, и на основе имеющихся данных проведен анализ термодинамических и структурных свойств глобулярных белков.

Температурная зависимость теплоемкости белка в водном растворе.

Экспериментальные данные микрокалориметрии свидетельствуют, что температурная зависимость парциальной теплоемкости белка в водном растворе линейна. Для компактных глобулярных белков при температуре 293 К она одинакова и равна, $[C]_p^{pr} = 0,31 \pm 0,02$ кал $г^{-1}$ град $^{-1}$ (1 кал = 4,184 Дж) [5]. Это значение является интегральной величиной и определяется суммой вкладов двух составляющих

$$[C]_p^{pr} = [C]_p^{vib} + [C]_p^{conf} \quad (1)$$

где $[C]_p^{pr}$ – парциальная теплоемкость белка в водном растворе, $[C]_p^{vib}$ – теплоемкость вибрационных мод, обусловленная вкладами ковалентно связанных атомов и рассчитана с применением инфракрасной и Раман-спектроскопии [6]. Ее численное значение равно, $[C]_p^{vib} = 0,25$ кал $г^{-1}$ град $^{-1}$. Тогда значение конформационной составляющей, обусловленная вкладами боковых цепей, составляет, $[C]_p^{conf} = 0,06$ кал $г^{-1}$ град $^{-1}$. Эту величину можно оценить также, используя значение конформационной энтропии, полученной нами на основе полуэмпирических расчетов Table 3 [4]. В качестве примера можно воспользоваться данными, например, для лизоцима со значением конформационной энтропии равной, $S^{conf} = 36,5$ Дж/К моль остатка. Взаимосвязь между энтропией и теплоемкостью, предложенная в работе [7] для вибрационной компоненты $C_p^{vib} = S^{vib} / 1,05$ справедливо и для конформационной составляющей, характеризуемая флуктуациями боковых цепей аминокислотных остатков. Тогда будем иметь $[C]_p^{conf} = S^{conf} / 1,05 = 36,5/1,05 = 34,8$ Дж/К моль остатка = 0,07 кал $г^{-1}$ град $^{-1}$ и на основании равенства (2) для теплоемкости белка имеем $[C]_p^{pr} = 0,25 + 0,07 = 0,32$ кал $г^{-1}$ град $^{-1}$. Это значение находится в пределах экспериментальной ошибки, полученной методом сканирующей калориметрии. Линейная температурная зависимость теплоемкости определяется как сумма вкладов вибрационной и конформационной компонент

$$d[C]_p^{pr}/dT = d[C]_p^{vib}/dT + d[C]_p^{conf}/dT \quad (2)$$

Численные значения $d[C]_p^{pr}/dT = (2,2 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ кал $г^{-1}$ град $^{-2}$ [1] и $d[C]_p^{vib}/dT = 1 \times 10^{-3}$ кал $г^{-1}$ град $^{-2}$ [2] и тогда для конформационной составляющей она равна, $d[C]_p^{conf}/dT = 1,2 \times 10^{-3}$ кал $г^{-1}$ град $^{-2}$. Из полученных данных

видно, что парциальная теплоемкость вибрационных мод ковалентно связанных атомов при 293 К превосходит конформационную составляющую парциальной теплоемкости белка приблизительно в четыре раза парциальную теплоемкость боковых цепей аминокислотных остатков, обусловленная в основном вкладами поверхностных остатков. Близкие значения температурных зависимостей теплоемкостей $d[C]_p^{\text{conf}}/dT$ и $d[C]_p^{\text{vib}}/dT$ свидетельствует о том, что интенсивность роста конформационной теплоемкости с температурой выше по сравнению с температурной зависимостью теплоемкости вибрационных мод. Из данных ЯМР следует, что боковые цепи остатков на поверхности глобулы претерпевают крупномасштабные флуктуации и участвуют в непрерывном процессе разрушения и образования водородных связей с участием полярных и заряженных остатков [4, 8]. На основании имеющихся результатов можно сделать вывод о том, что линейная температурная зависимость парциальной теплоемкости белка, в исследуемой области температур, свидетельствует об отсутствии фазовых переходов второго рода, связанных с изменением объема или иных признаков конформационных изменений в структуре белка вплоть до начала кооперативного разрушения ее трехмерной структуры. Основываясь на данных, приведенных выше, о свойствах теплоемкости белка и ее температурной зависимости в водном растворе, и в соответствии с равенством

$$G^{\text{NC}}(T) = E - T_{\text{tr}} \cdot S^{\text{NC}} \quad (3)$$

(где G^{NC} – абсолютная свободная энергия нативной конформации белка, E – энергия внутримолекулярных связей, S^{NC} – энтропия нативной конформации белка) можно утверждать, что с ростом температуры абсолютная свободная энергия, $G^{\text{NC}}(T)$, убывает в результате возрастающей с температурой энергии теплового движения, $T \cdot S^{\text{NC}}$. В пред-переходном состоянии при температуре, близкой к температуре кооперативного конформационного перехода белок сохраняет все элементы нативной структуры, определяемое нами как референтное состояние [4]. В этом состоянии энергия теплового движения становится сопоставимой с энергией слабых связей, приводя значение свободной энергии нативного белка близкое к нулю. Значение конформационной энтропии определяется как $S^{\text{NC}} = E/T_{\text{tr}}$. Энергия слабых связей в компактных белках с массой 7-24 кДа одинакова и составляет $12,8 \pm 0,8$ кДж/моль остатка, T_{tr} – температура перехода. Основополагающий вывод состоит в том, что конформационная энтропия нативного белка, S^{NC} , определяемая в основном преобладающим вкладом поверхностных остатков, является независимым от температуры параметром. Такой вывод основан на данных ЯМР белков и состоит в том, что подвижные боковые цепи на поверхности белка формируют конформационное пространство, в пределах которого индивидуальный остаток реализует множество изоэнергетических ротамерных состояний. В рассматриваемой модели допускается, что с повышением температуры число ротамеров остается неизменным, но при этом возрастает частота перескоков из одного конформационного состояния в другое. Численное значение S^{NC} анализируемых белков при 298 К находится в пределах, 34,4-39,1 Дж/К моль остатка. Рассчитываемые значения абсолютной свободной энергии белков, G^{NC} , в соответствии с равенством (3) при 298 К находятся в пределах 1,15-2,55 кДж/моль остатка близкое к значению энергии теплового движения, определяемая величиной kT . Отсюда следует, что нативная структура белка находится на грани стабильности.

Заключение.

Современное представление о пространственно- организационной структуре и динамических свойствах глобулярных белков в водном растворе является результатом прогрессивного развития методов РСА и ЯМР и опубликованных работ за последние, примерно, 25 лет. К примечательной особенности глобулярного белка следует отнести две структурные области, несущие разную функциональную нагрузку. Внутренняя область представляется как плотное ядро, сформированное неполярными боковыми цепями остатков и элементами вторичной структуры, включающими α - и β -конформации, как основной источник водородных связей. На поверхности белка располагаются преимущественно полярные и заряженные боковые цепи аминокислотных остатков. Они обладают высокой подвижностью, оцениваемые пикосекундным интервалом времени [7]. Каждая боковая цепь формирует конформационное пространство, в пределах которого она изоэнергетически преобразуется из одного конформационного состояния в другое и несет определяющую нагрузку по функциональной обеспеченности белков-ферментов. Из анализа равенства (3) для ядра макромолекулы следует ожидать высокое значение свободной энергии, обусловленное энергией слабых внутримолекулярных взаимодействий, E , и низкого значения величины $T \cdot S^{\text{conf}}$, а свободная энергия поверхности нативного белка должна быть близка к нулю. Отсюда также можно заключить, что энергетический барьер, разделяющий конформационное состояние остатков крайне низок. Это важное свойство белков-ферментов и оно обеспечивает выполнение функциональных задач – катализ биохимических реакций, а также белок-белкового и белок-ДНК узнавания. Эту роль выполняют аминокислотные остатки, целенаправленно располагающиеся на поверхности белка, формируя активные центры. Современные данные о разнообразии белков с различной структурной организацией и функциональными свойствами позволяют заключить, что внутриклеточный синтез белка является результатом генетически детерминированного процесса посредством переноса генетической информации по пути ДНК – мРНК – рибосомальный комплекс [9-11]. Детерминированность синтеза белка включает в себя прямолинейные тяжи полипептидной цепи, повороты, формирование вторичной структуры и гидрофобного ядра, и дальнейшее приобретение функционально активных форм нативного белка с участием системы шаперонов. Что касается формирования пространственной структуры белка с заданными свойствами, нам представляются прогрессивными работы по поиску механизма трехмерного конструирования структуры

белка [12]. Они указывают на взаимосвязь между торсионными ϕ , ψ углами основной и χ_1 углами боковой цепи, зависящими от типов аминокислотных остатков. Серьезность таким выводам придают работы по обнаружению высоких численных значений энергетических барьеров вращения вокруг NC^α и C^αC связей основной цепи [13 и ссылки в ней]. Этим, по-видимому, можно объяснить, что энергия теплового движения (энтропийный фактор) не способна полностью преодолеть энергетические барьеры и развернуть полипептидную цепь белка. В таком случае справедливее говорить о тепловой денатурации, а также о денатурации химическими агентами, как о процессе перехода типа «порядок-беспорядок» в состояние клубка с разрушенными внутримолекулярными слабыми связями и гидратированной поверхностью остатков во внутренней области белка. По мере удаления возмущающего фактора и благодаря свойствам полипептидной цепи, структура белка будет возвращаться в исходное нативное состояние. По-видимому, справедливее говорить о целенаправленном ко-трансляционном механизме синтеза белка на рибосоме.

Список литературы / References:

1. Lumry R., Biltonen R. (1969). Thermodynamic and kinetic aspects of protein conformations in relation to physiological functions. In Timasheff S.N., Fasman G.D. (Eds.). *Structure and stability of biological macromolecules*, New York, M. Dekker, pp. 65-212.
2. Brandts J.F. Conformational transition of proteins in water and in aqueous mixture. In Timasheff S.N., Fasman G.D. (Eds.). *Structure and stability of biological macromolecules*, New York: M. Dekker, 1969, pp. 213-220.
3. Creighton Th.E. Protein folding. *Biochem. J.*, 1990, vol. 270, pp. 1-16.
4. Khechinashvili N.N., Kabanov A.V., Kondratyev M.S., Polozov R.V. Thermodynamics of globular proteins. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2018, vol. 36, no. 3, pp. 701-710.
5. Privalov P.L., Khechinashvili N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study. *J. Mol. Biology*, 1974, vol. 86, pp. 665-684.
6. Kanehisa M.I., Ikegami A. Structural changes and fluctuations of proteins. II. Analysis of the denaturation of globular proteins. *Biophys. Chemistry*, 1977, vol. 6, pp. 131-149.
7. Sturtevant J.M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1977, vol. 74, pp. 2236-2240.
8. Jarymowycz V.A., Stone V.J. Fast time scale dynamics of protein backbones NMR relaxation methods, applications and functional consequences. *Chemical Reviews*, 2006, vol. 106, pp. 1624-1671.
9. Petermann M.L. The physical and chemical properties of ribosomes. *Elsevier Publ. Co. Amsterdam-London-New York*, 1964.
10. Roberts R.B. Studies of macromolecular biosynthesis. *Carnegie Institution*, Washington, 1964.
11. Спирин А.С., Гаврилова Л.П. *Рибосомы*. М.: «Найка», 1979. [Spirin A.S., Gavrilo L.P. *Ribosomy*. M.: «Nauka», 1979. (In Russ.)]
12. Chakrabarti P., Pal D. Review. The interrelationships of side-chain and main-chain conformations in proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2001, vol. 76, pp. 1-102.
13. Basharov M.A. The internal rotational barriers about NC^α and C^αC backbone bonds of polypeptides. *Eur. Biophys. J.*, 2012, vol. 41, pp. 53-61.
14. Tanford C. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, 1968, vol. 23, pp. 121-282.

THERMODYNAMICS OF GLOBULAR PROTEINS NATIVE STRUCTURE

Khechinashvili N.N., Kondratyev M.S.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences
Pushchino, 142290, Russia; e-mail: nikolay@icb.psn.ru

Abstract. The analysis of the temperature dependence of the heat capacity of the native structure of globular proteins in an aqueous solution is carried out. It is shown that this dependence is linear. This is due to the constituent contributions of the vibrational and conformational heat capacity and indicates the absence of second-order phase transitions up to the start of the main conformational transition. The protein macromolecule has a two-level organization of spatial structure. The inner region of the protein is the “core” responsible for the stability of the globular structure. Lateral radicals of amino acid residues of the surface layer are dynamic and form the basis of the biological function of the protein.

Key words: bond energy, entropy, absolute free energy.

РАЗДЕЛЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ И АЦЕТОНОВОГО ЭКСТРАКТА МИКРОВОДОРОСЛИ *TETRASELMIS VIRIDIS* НА СПЕКТРЫ ОТДЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ

Чернышев Д.Н.¹, Горбунова С.Ю.², 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: 09.07.2020

Аннотация. В работе проведено разделение спектра поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* методом GPS на спектры отдельных пигментов. Основными пигментами оказались лютеин, неоксантин хлорофилл *a* и хлорофилл *b*. В спектре культуры с помощью производной второго порядка выявлены отдельные максимумы поглощения. Полученные данные взяты за основу при составлении модели спектра нативных форм пигментов. Предложены модели нативных форм хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, и суммарных фотопротекторных каротиноидов. Полученные математические модели спектров поглощения отдельных пигментов и литературные коэффициенты экстинкции могут быть использованы для быстрого расчета концентраций пигментов в культуре.

Ключевые слова: морские микроводоросли, *Tetraselmis viridis*, хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, спектры поглощения, гауссианы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из методических задач является быстрое и достаточно точное определение пигментного состава микроводорослей.

Разделение физико-химическими методами смеси пигментов на отдельные составляющие часто приводит к искаженным результатам исследований, из-за нарушения системы комплексных межмолекулярных взаимодействий. Изменения в окружении хромофорных групп могут повлечь за собой изменения спектральных характеристик. В частности, сдвиг максимумов поглощения хлорофилла *a* нативной форме и в ацетоновом экстракте. [1]

Одним из решений проблемы является разложение нативного спектра поглощения математическими методами. Данная задача требует разработки способа разложения спектра поглощения культуры на спектры отдельных пигментов.

В настоящей работе нами проанализированы спектральные свойства ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* и нативный спектр поглощения культуры данной микроводоросли.

Целью настоящей работы явилось разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения отдельных пигментов в спектре поглощения культуры, поскольку спектроскопия до сих пор остается одним из наиболее эффективных и доступных методов при анализе свойств пигментов.

Микроводоросль *Tetraselmis viridis* была выбрана в качестве объекта исследования, поскольку содержит хлорофилл *a*, хлорофилл *b* и типичные для отдела *Chlorophyta* фракции каротиноидов. А именно β -каротин, зеоксантин, лютеин и ксантофиллы виолоксантинового ряда (неоксантин и виолоксантин). [2]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали альгологически чистую культуру *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) [3] – штамм IBSS-25 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН». *Tetraselmis (Platymonas) viridis* Rouch. впервые был описан [4] и выделен в культуру из Чёрного моря.

Питательная среда готовилась на основе нестерильной черноморской воды с солёностью 1,4-1,8 ‰. Состав среды для культивирования *T. viridis* в плотной культуре приведён в работе [5]. С целью обеспечения чистоты эксперимента и предотвращения заражения культуры другими видами микроводорослей уровень солёности в среде доводили до средиземноморского, путём добавления 15 г/л NaCl.

Для получения инокулята, *T. viridis* в течение 5-7 суток выращивали методом накопительной культуры [6], при котором систематического внесения элементов питания в среду не происходит, а плотность микроводорослей увеличивается и достигает максимального значения. Для засева экспериментального культиватора использовали активно делящуюся культуру, взятую на линейной стадии роста, когда её продуктивность максимальна.

T. viridis выращивали накопительным методом в стеклянном культиваторе плоскопараллельного типа [7], с рабочим объёмом 3 л при боковом поверхностном освещении 10 кЛк. Освещённость поверхности фотобиореакторов определяли люксметром Ю-116. С целью компенсации испарения воды, на протяжении всего

эксперимента поддерживали этот объём, доливая перед измерениями дистиллированную воду до отметки 3 л. Скорость продувки воздухом через распылители в культуре составляла $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$. Температура среды автоматически поддерживалась на уровне 24°C , которую контролировали ртутным термометром непосредственно в культиваторе, абсолютная погрешность измерений составляла $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Для засева экспериментальных культиваторов использовали активно делящуюся культуру, начальная плотность составляла $0,06 \text{ г/л}$ сухого вещества.

Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на Unico 2100 (United Products & Instruments, USA) при длине волны 750 нм , абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышала $1,0 \%$. Параллельно аналогичные измерения производили с помощью прибора КФК 2. Показания плотности на разных приборах не выявили различий, превышающих абсолютную погрешность. При пересчёте единиц оптической плотности на сухой вес микроводорослей (CB) использовали эмпирически определённый коэффициент k , равный $0,8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \text{ ед.опт.пл}^{-1}$; $\text{CB} = k \times D_{750} \cdot 0,8$ [8]. Определение плотности по сухому весу и подсчёт концентрации клеток в камере Горяева производили в пятикратной повторности по методикам, описанным в работе [9]. Микроскопический контроль культуры производили с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия).

Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном (100%) [10]. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов фиксировались на спектрофотометре СФ 2000, 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.

Оценку пигментного состава по спектру поглощения ацетонового экстракта проводили по стандартной методике, с использованием линейных уравнений по 3 точкам в спектре поглощения экстракта [11]. Так же оценка пигментного состава была проведена при анализе спектров методом GPS [12].

Математическую обработку и моделирование экспериментальных данных осуществляли с помощью компьютерных программ «Grapher3», «Excel», «SciDAVis», «MagicPlot».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост *T. viridis* контролировали в течение 16 суток. Были рассчитаны основные кинетические характеристики роста культуры, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1. Кинетические характеристики роста культуры *T. viridis*

Параметр	Числовой показатель
Начальная биомасса, г АСВ/л	0,06
Удельная скорость роста, сут^{-1} , $R_{sq}=0,99$	0,43
Продуктивность, г АСВ/л, $R_{sq}=0,99$	0,12
Максимальное количество клеток в 1 мл	$7,46 \cdot 10^6$
Урожай, г/3л	2,76

За 6 суток выращивания биомасса *T. viridis* увеличилась в двенадцать раз.

Учитывая, что культура росла без дополнительной подачи углерода, полученные значения по продуктивности и удельной скорости роста сопоставимы с данными, представленными в работе [13].

Содержание пигментов было вычислено по спектру поглощения ацетонового экстракта как стандартным методом [11], так и методом GPS [12] суть которого заключается в аппроксимации спектра поглощения суммой моделей пигментов. Однако спектры зеоксантина и β -каротина очень сходны и при анализе спектров методом GPS разделить их невозможно, поэтому они оцениваются вместе [12].

Для анализа спектральных свойств ацетонового экстракта микроводоросли *T. viridis* в математическую модель на первом этапе были заложены следующие пигменты: хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, β -каротин, лютеин, неоксантин, виолоксантин.

Разделение показало, что основные каротиноиды это лютеин и неоксантин, которые можно отнести к фотопротекторным каротиноидам.

Так же был проведен анализ нативного спектра поглощения культуры. Из литературы [1, 2] известно, что спектры поглощения нативных форм хлорофиллов и каротиноидов сдвигаются по отношению к ацетоновым экстрактам. Максимум хлорофилла *a* в красной области сдвигается на 12 нм , а в синей области на 8 . Для хлорофилла *b* сдвиг в красной области составляет 6 нм , а в синей 12 нм . Для фотопротекторных каротиноидов, в частности β -каротина, сдвиг составляет 10 нм .

На рисунке 2 показаны спектры поглощения зелёной водоросли *T. viridis* измеренные *in vitro* и *in vivo*.

Спектры различаются величинами оптической плотности и сдвигом синего и красного максимумов. Кроме сдвига максимумов в нативном спектре, поглощение света меньше, чем в ацетоновом экстракте.

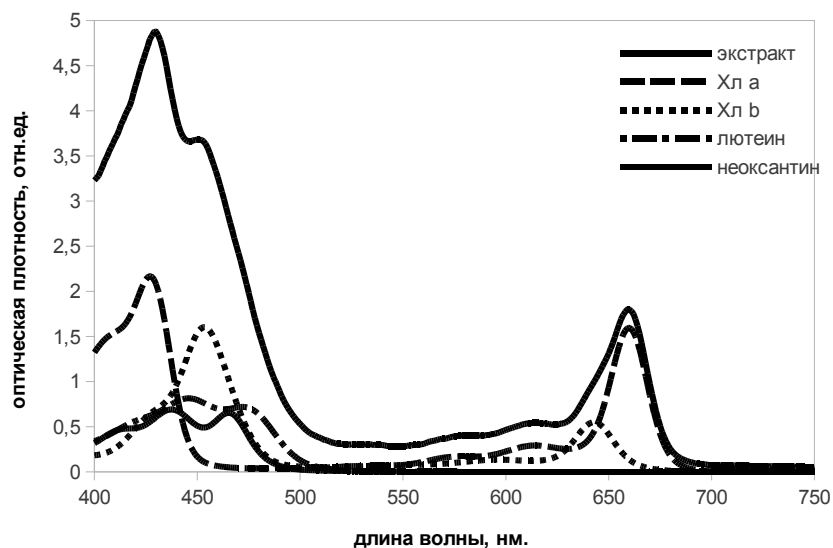


Рисунок 1. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта *T. viridis* методом GPS

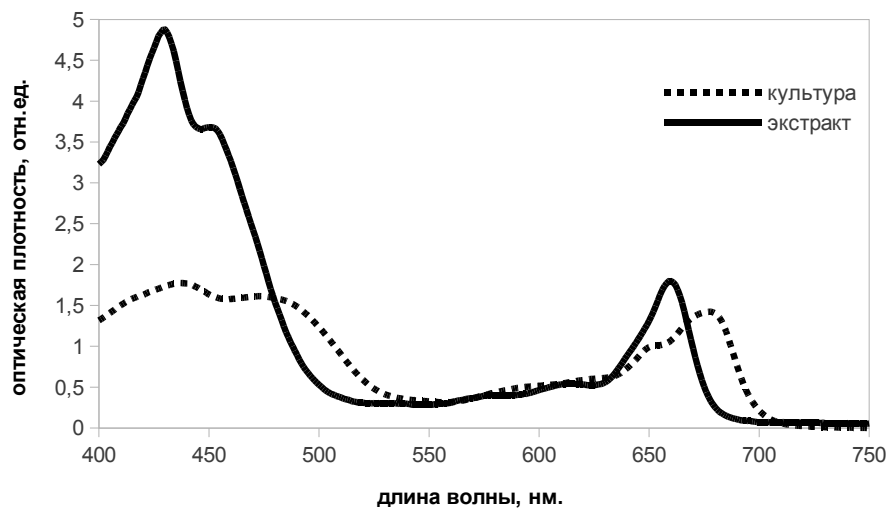


Рисунок 2. Спектры поглощения *T. viridis* in vitro и in vivo пересчитанные в чистом виде (с учетом разбавления) на 1 см оптического пути

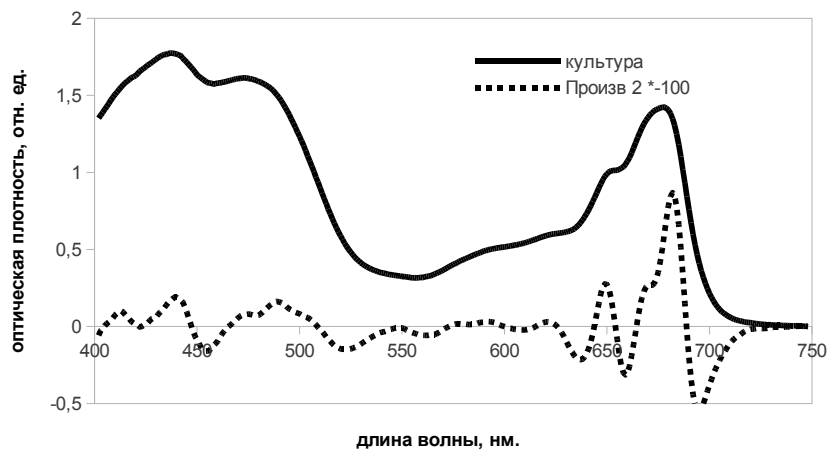


Рисунок 3. Спектр поглощения культуры *T. viridis* и его производная второго порядка ($\times 100$)

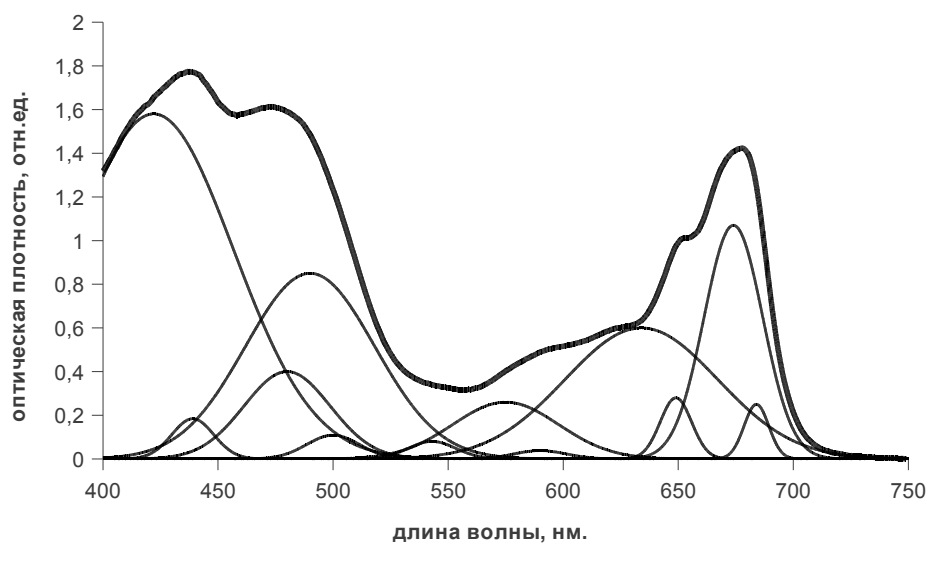


Рисунок 4. Разделение спектра поглощения культуры *T. viridis* на отдельные кривые Гаусса

Уменьшение поглощения света *in vivo* связано с тем, что пигменты, упакованные в клетке, менее эффективно поглощают свет в сравнении с их ацетоновым экстрактом. Это связано с упаковкой пигментов внутри хлоропласта, что приводит к самозатенению пигментов при их высоком внутриклеточном содержании и, как следствие, к уменьшению величин удельных коэффициентов поглощения света [2].

Было проведено разделение нативного спектра поглощения на отдельные кривые Гаусса, а затем соотношение каждой кривой с соответствующим пигментом. Для более точного определения максимумов была использована вторая производная спектра поглощения культуры микроводоросли.

На представленном графике проявляется сложная структура и заметны отдельные узкие полосы. Производная второго порядка позволяет точно выявить максимумы в спектре поглощения. Контур второй производной и других производных чётного порядка похож на исходный спектр, но имеет меньшую ширину [14].

Весь спектр поглощения был описан суммой кривых Гаусса со значениями максимума в пиках второй производной. Каждый пик описан формулой:

$$D(\alpha) = D_{\max} e^{-0.5 \left(\frac{\alpha_i - \alpha_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

где $D(\alpha)$ – оптическая плотность;

α_i – длина волны, нм;

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

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

σ – полуширина пика, нм.

Полученные данные приведены в таблице 2.

Анализируя литературные данные [1, 15], можно связать пики с конкретными пигментами, а именно:

Хл а — 421.6; 439.4; 574.7; 634.7; 674.7; 683.6;

Хл б — 478.9 ; 589.6; 649.2

Суммарные каротиноиды: 490,3; 500,0; 543.3

Полученные данные (максимумы, соотношения амплитуд, и полуширины) можно использовать как математическую модель отдельных пигментов. Пример разделения спектра представлен ниже.

Таблица 2. Рассчитанные характеристики отдельных пиков в спектре поглощения культуры

№ пика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Максимум, $\lambda_{\max}$	421,6	439,4	478,9	490,3	500,0	543,3	574,7	589,6	634,2	649,2	674,7	683,6
Амплитуда, $D_{\max}$	1,5767	0,1837	0,4013	0,8447	0,1088	0,0794	0,2578	0,0381	0,5994	0,2803	1,0736	0,2479
Полуширина, σ	40,8	10,7	21,8	33,0	13,5	12,2	27,4	13,3	38,6	7,8	14,9	6,3

Известно, что при смещении полосы поглощения хлорофилла, коэффициент экстинкции примерно одинаков в ацетоновом растворе и водном экстракте в красной области [16]. Таким образом, можно использовать максимумы разделенных пигментов, для расчета концентрации используя стандартные значения экстинкции. [17].

Ниже предложена модель для аппроксимации спектра поглощения культуры. В данной модели 3 неизвестных величины – концентрации хлорофилла а, хлорофилла b, и концентрация суммарных каротиноидов.

$$\begin{aligned}
 D(\lambda) &= D_{\text{Хла}}(\lambda) + D_{\text{Хлб}}(\lambda) + D_{\text{сум.кар.}}(\lambda) \\
 D_{\text{Хла}}(\lambda) &= C_{\text{Хла}} \varepsilon_{\text{Хла}} (1,111e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 421,6}{40,8} \right)^2} + 0,129e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 439,4}{10,7} \right)^2} + \\
 &+ 0,181e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 574,7}{27,4} \right)^2} + 0,424e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 634,2}{38,6} \right)^2} + 0,766e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 674,7}{14,9} \right)^2} + 0,149e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 683,6}{6,3} \right)^2}) \\
 D_{\text{Хлб}}(\lambda) &= C_{\text{Хлб}} \varepsilon_{\text{Хлб}} (1,437e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 478,9}{21,8} \right)^2} + 0,136e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 589,6}{13,3} \right)^2} + 1,002e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 649,2}{7,8} \right)^2}) \\
 D_{\text{сум.кар.}}(\lambda) &= C_{\text{сум.кар.}} \varepsilon_{\text{сум.кар.}} (0,906e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 490,3}{33,0} \right)^2} + 0,117e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 500,0}{13,5} \right)^2} + 0,085e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda - 543,3}{12,2} \right)^2})
 \end{aligned} \quad (2)$$

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

$D_{\text{Хла}}(\lambda)$ – оптическая плотность хлорофилла а

$D_{\text{Хлб}}(\lambda)$ – оптическая плотность хлорофилла b

$D_{\text{сум.кар.}}(\lambda)$ – оптическая плотность суммарных каротиноидов.

$C_{\text{Хла}}(\lambda)$ – концентрация хлорофилла а (г /л)

$C_{\text{Хлб}}(\lambda)$ – концентрация хлорофилла b (г /л)

$C_{\text{сум.кар.}}(\lambda)$ – концентрация суммарных каротиноидов (грамм /литр)

$\varepsilon_{\text{Хла}}$ – экстинкция хлорофилла а $88,15 \text{ (л г}^{-1} \text{ см}^{-1})$ [17]

$\varepsilon_{\text{Хлб}}$ – экстинкция хлорофилла b $51,36 \text{ (л г}^{-1} \text{ см}^{-1})$ [17]

$\varepsilon_{\text{сум.кар.}}$ – экстинкция суммарных каротиноидов (лютеин) $255 \text{ (литр г}^{-1} \text{ см}^{-1})$ [17]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод разделения нативного спектра поглощения культуры можно использовать на практике для быстро определения содержания пигментов, не прибегая к их экстракции. Поскольку в точке максимума хлорофилла а 677 нм другие пигменты (каротиноиды и хлорофилл b) не вносят существенный вклад, то можно использовать значение оптической плотности в данной точке для вычисления концентрации хлорофилла а, разделив данное значение на величину экстинкции хлорофилла а - $88,15 \text{ (л г}^{-1} \text{ см}^{-1})$ [17]. Для более точного анализа пигментов и разделения каротиноидов рекомендуем использовать анализ ацетонового экстракта микроводоросли методом GPS [12]

Исследования выполнены в рамках Госзадания ФИЦ ИнБЮМ № АААА-А18-118021350003-6.

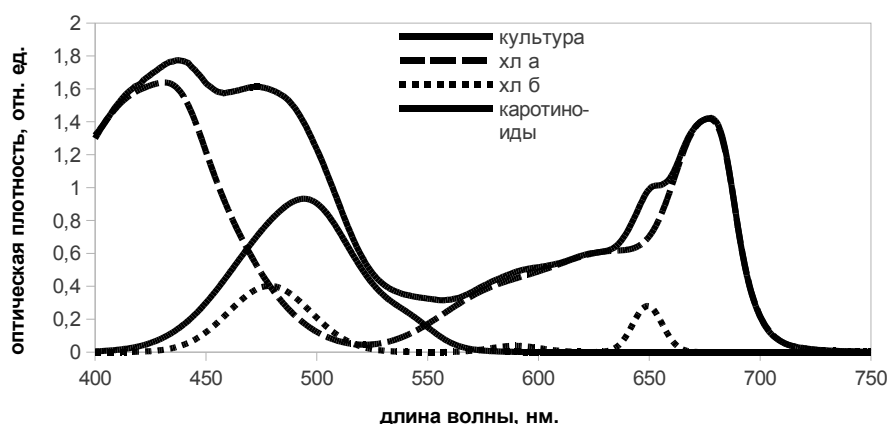


Рисунок 5. Разделение спектра поглощения культуры на спектры отдельных пигментов

Список литературы / References:

1. 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. 290-302.
2. Чурилова Т.Я., Финенко З.З., Акимов А.И. *Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. [Churilova T.Ya., Finenko Z.Z., Akimov A.I. *Black Sea microalgae: problems of biodiversity conservation and biotechnological use*. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysics, 2008. (In Russ.)]
3. Guiry M.D., Guiry G.M. 2019. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M.D. Guiry). *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara, 1980, URL: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=838159> on 2019-12-10.
4. Роухияйнен М.И. Новый вид рода *Platymonas* (Chlorophyta) из зеленых водорослей. *Новости систематики низших растений*. М.-Л: Наука, 1966. с. 82-85. [Rokhiyaynen M.I. A new species of the genus *Platymonas* (Chlorophyta) from green algae. *News of the taxonomy of lower plants*. М.-L: Nauka, 1966, pp. 82-85. (In Russ.)]
5. Тренкеншу Р. П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Изв. СО АН СССР (сер. Биол.)*, 1981, № 15, вып. 3, с. 75-82. [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Izv. SB USSR Academy of Sciences (ser. Biol.)*, 1981, no. 15, iss. 3, pp. 75-82. (In Russ.)]
6. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура. *Экология моря*, 2005, вып. 67, с. 89-97. [Trenkenshu R.P. The simplest models of microalgae growth. 1. Periodic culture // *Ecology of the sea*, 2005, iss. 67, pp. 89-97. (In Russ.)]
7. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13). URL: <http://algology.ru/1097> [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified installation for laboratory research of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1 (13). URL: <http://algology.ru/1097>. (In Russ.)]
8. Боровков А.Б., Геворгиз Р.Г. Продуктивность *Spirulina platensis* и *Tetraselmis viridis* при использовании различных методов культивирования. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 9-13. [Borovkov A.B., Gevorgiz R.G. Productivity of *Spirulina platensis* and *Tetraselmis viridis* when using various cultivation methods. *Ecology of the Sea*, 2005, iss. 70, pp. 9-13. (In Russ.)]
9. Владимирова М.Г., Семененко В.Е. *Интенсивная культура одноклеточных водорослей*. Москва. АН СССР, 1962, 60 с. [Vladimirova M.G., Semenenko V.E. *Intensive culture of unicellular algae*. Moscow. USSR Academy of Sciences, 1962, 60 p. (In Russ.)]
10. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015. [Kopytov Yu.P. et al. Methodology for the complex determination of the biochemical composition of microalgae. *Algology*, 2015. (In Russ.)]
11. Wellburn R.W. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 1994, vol. 144, no. 3, pp. 307-313.
12. 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.
13. Raes E.J., Isdepsky A, Muylaert K, Borowitzka M.A, Moheimani N.R. Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. *J. Appl. Phycol.*, 2014, vol. 26, pp. 247-255, DOI: 10.1007/s10811-013-0077-5.
14. Гуляев Б.А., Литвин Ф.Ф. Первая и вторая производная спектра поглощения хлорофилла и сопровождающих пигментов в клетках высших растений и водорослей при 20°C. *Биофизика*, 1970, т. 15, № 4, с. 670-680. [Gulyaev B.A., Litvin F.F. The first and second derivative of the absorption spectrum of chlorophyll and accompanying pigments in the cells of higher plants and algae at 20°C. *Biophysics*, 1970, vol. 15, no. 4, pp. 670-680. (In Russ.)]
15. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, vol. 73, no. 1, pp. 11-23.
16. Smith E.L. The action of sodium dodecyl sulfate on the chlorophyll-protein compound of the spinach leaf. *The Journal of General Physiology*, 1941, vol. 24, no. 5, p. 583.
17. Mantoura R. F. C., Wright S. W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *Oceanographic Literature Review*, 1997, vol. 10, no. 44, p. 1110.

DECOMPOSITION OF CULTURAL ABSORPTION SPECTRA AND THE ACETONE EXTRACT OF MICROALGAE *TETRAELMIS VIRIDIS* INTO SPECTRUM OF INDIVIDUAL PIGMENTS**Chernyshev D.N.¹, Gorbunova S.Yu.², Trenkenshu R.P.²**¹ Sevastopol State University*Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: chernishev@gmail.com*² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS*Nakhimov str., 2, Sevastopol, 299011, Russia*

Abstract. In this work, we divided the absorption spectrum of the acetone extract of the *Tetraselmis viridis* microalgae by GPS into the spectra of individual pigments. The main pigments were lutein, neoxanthin chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. In the culture spectrum, using the second-order derivative, individual absorption maxima were revealed. The data obtained are taken as a basis when compiling a model of the spectrum of native pigment forms. Models of native forms of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total photoprotective carotenoids are proposed. The obtained mathematical models of the absorption spectra of individual pigments and literature extinction coefficients can be used to quickly calculate the concentration of pigments in the culture.

Key words: *marine microalgae, Tetraselmis viridis, chlorophyll a, chlorophyll b, absorption spectra, gaussians.*

ДЕКОМПОЗИЦИЯ КРАСНОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ – НАЧАЛЬНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Гулин А.С.¹, Тренкеншу Р.П.,¹ Чернышев Д.Н.²

¹ ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
ул. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: gulins_gent@mail.ru

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. В работе описан выбор логической модели, а также режима стабилизации для систем автоматического контроля роста микроводорослей. Спектры поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina*, были количественно описаны тремя кривыми Гаусса в области от 550 до 700 нм. Так же описаны нормированные спектры культур микроводоросли *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* и определена разность спектров поглощения в области 550-700 нм. По результатам аппроксимации разности спектров поглощения культур, получена модель хлорофилла *b*. На основании полученных данных, а также их сравнения, сделан вывод, что данная модель удовлетворяет требованиям, предъявляемым к проектируемой приборной базе.

Ключевые слова: спиролина, хлорофилл *a*, спектры поглощения, гауссианы, система автоматического контроля роста микроводорослей.

ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации пигментов в культурах микроводорослей, является сложной задачей, как в теоретическом, так и в практическом плане. Количественное определение пигментов является важной задачей в физиологии фотосинтетических организмов, поскольку состав пигмента различается в зависимости от вида, ткани и физиологического состояния. В настоящее время доступные различные методы определения, но они либо ограничены очень немногими пигментами (классические УФ/ВИС спектроскопические методы), либо они отнимают много времени, либо слишком трудоемкие или требуют дорогостоящей приборной базы (например, ВЭЖХ).

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.

Создание современного спектрофотометрического оборудования и автоматизированных систем контроля роста микроводорослей, требуют от нас разработки моделей и алгоритмов для определения концентрации пигментов в культурах.

Существующие устройства не лишены ряда проблем, таких как высокая стоимость и сложность реализации, а также не универсальность и узкая направленность. Существующие системы обратной связи, работают в различных режимах стабилизации (турбидостат, pH-стат, хлорофиллостат и т. п.). Все режимы имеют свои достоинства и недостатки, но наибольшую точность и стабильность, может обеспечить только режим хлорофиллостата.

Режим хлорофиллостата заключается в стабилизации хлорофилла *a*, как основного пигмента. Для стабилизации его значения, необходимо создать прибор, который будет непрерывно измерять значение хлорофилла *a*.

При разработке подобного устройства, мы неизбежно сталкиваемся с рядом сложностей. Хлорофилл *a* имеет спектральные характеристики, и чтобы определить его значение, необходимо отделить от других пигментов. Для этого нужно обеспечить выбор по длине волны. В нативной культуре, максимум хлорофилла *a* в красной области приходится на 680 нм, но там же накладывается и хлорофилл *b*, что приводит к задаче определения формулы, для отделения хлорофилла *a* от хлорофилла *b*.

Для примера рассмотрим спектры культур *Platimonas viridis* и *Dunaliella salina* в красной области (рис. 1).

После нормировки максимумы в красной области совпадают, но плечо хлорофилла *b* разное.

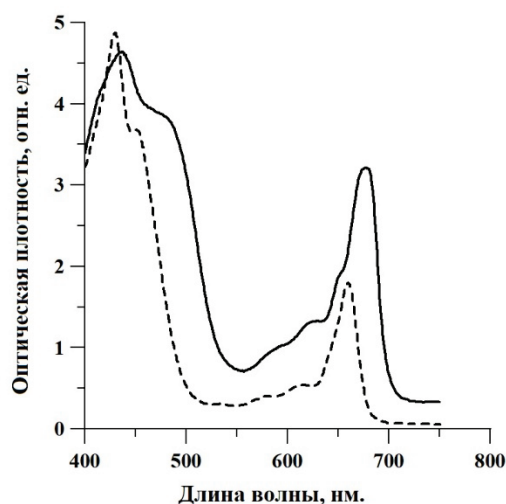


Рисунок 1. Спектр поглощения культуры микроводоросли *Platimonas viridis* и *Dunaliella salina*

Современной науке хорошо известны способы определения пигментов в нативной культуре микроводорослей. Так, с хорошей точностью концентрация хлорофилла *a* коррелирует с красным максимумом поглощения в области длины волны 680 нм, определенной, 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].

В то же время, хорошо изучены оптические свойства пигментов, выделенных из клетки с помощью различных растворителей [4]. Было установлено, что спектры растворов пигментов имеют несколько максимумов, каждый из которых определяется наличием хромофорных групп. Эти группы симметрично распределены относительно максимума, что позволяет количественно описать зависимость поглощения от длины волны в виде суммы гауссиан или лоренциан. [5]

Этот подход применим для растворов хлорофиллов и каротиноидов [6]. При переходе к нативным формам пигментов максимумы сдвигаются. [7]

Спектр поглощения культур микроводорослей от 400 до 750 нм характеризуется сплошной кривой, отражая сильную связь в передаче энергии между молекулами пигментов. Непрерывный характер спектра, в свою очередь затрудняет оценку вклада в общее поглощение каждым видом пигмента, если только спектр не может быть соответствующим образом разложен. Данный метод основан на описании каждого спектра пигмента серией пиков Гаусса.

В данной работе представлена возможность использования описанного выше метода, для определения концентрации пигментов в культурах микроводорослей, как логической модели для автоматической системы контроля микроводорослей.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Культуру *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl, из коллекции культур ФИЦ ИНБИОМ РАН, выращивали в культиваторах на среде «Zagrouk», в накопительном режиме, освещенность поверхности культиватора – 80 Вт/м², температура – 26-28°C.

Экстрагирование пигментов из клеток микроводоросли производилось 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.

Опишем спектр поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Spirulina platensis* в области 550-700 нм (рис. 2).

Зададим базовую линию на уровне 0,009, соответствующую нулевому значению оптической плотности на длине волны 750 нм.

Для моделирования выберем область спектра от 550 до 700 нм т.к. спектральные характеристики хлорофилла *a* особенно велики. Спектр ацетонового экстракта хлорофилла *a* *S. platensis*, был описан в области 550-700 нм тремя кривыми Гаусса (рис. 3).

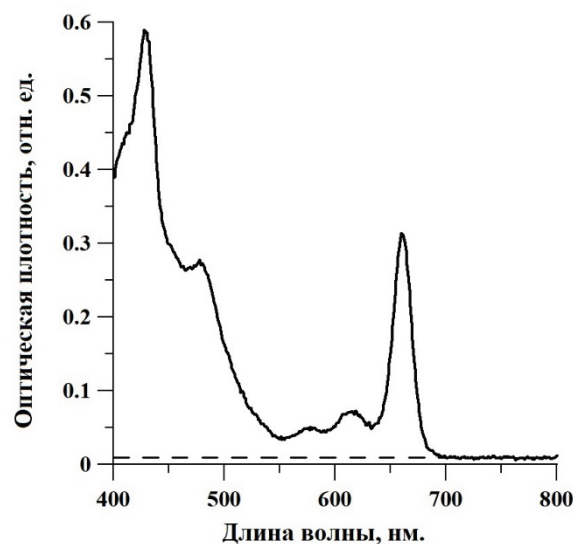


Рисунок 2. Спектр поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Spirulina platensis*

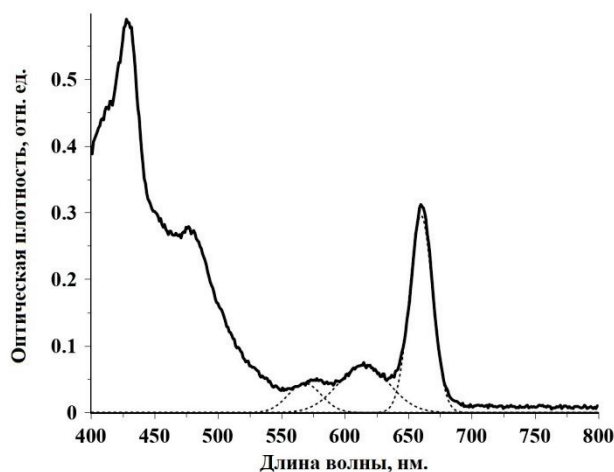


Рисунок 3. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* в области 550-700 нм

$$D(\alpha) = \sum_{i=1}^n D_{\max} \exp\left(-\frac{(\alpha - \alpha_{\max})^2}{2\sigma^2}\right)$$

где $D(\alpha)$ – оптическая плотность;

α_i – длина волны, нм;

$\alpha_{\max}$ – 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 0,946. Результаты аппроксимации приведены в таблице 1.

Нормированные по амплитуде результаты приведены в таблице 2.

Таблица 1. Коэффициенты модели ацетонового экстракта хлорофилла *a*.

№ пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	568,5	15,4	0,048
2	615	23,74	0,071
3	660,16	10,2	0,2955

Таблица 2. Коэффициенты модели ацетонового экстракта хлорофилла *a* после нормировки по амплитуде

№ пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	568,5	15,4	0,15
2	615	23,74	0,24
3	660,16	10,2	1

Основная проблема, возникающая 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, в результате это приводит к изменению максимумов поглощения и к изменению полуширины отдельных пиков. Пики нативного хлорофилла *a* в области 550-730 нм сдвигаются на +12 нм [7]. На положение максимумов в области до 580 нм оказывает влияние, наличие каротиноидов, которые вносят вклад в спектр поглощения.

Опишем нормированный спектр поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Dunaliella salina* в области 550-700 нм (рис. 4).

Опишем спектр ацетонового экстракта хлорофилла *a* *Dunaliella salina* в области 550-700 нм тремя кривыми Гаусса (рис. 5).

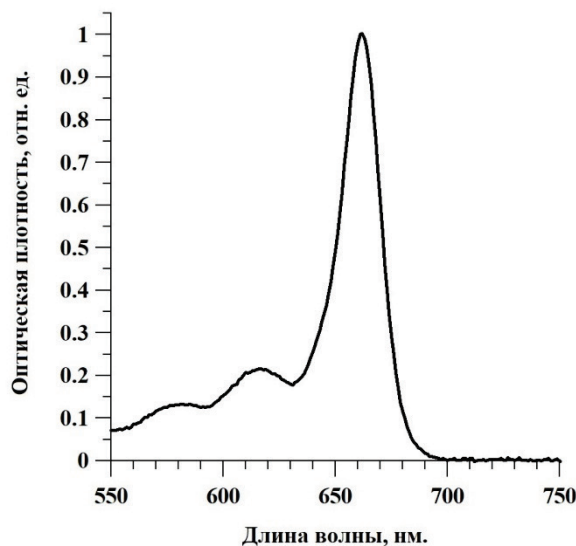


Рисунок 4. Спектр поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Dunaliella salina*

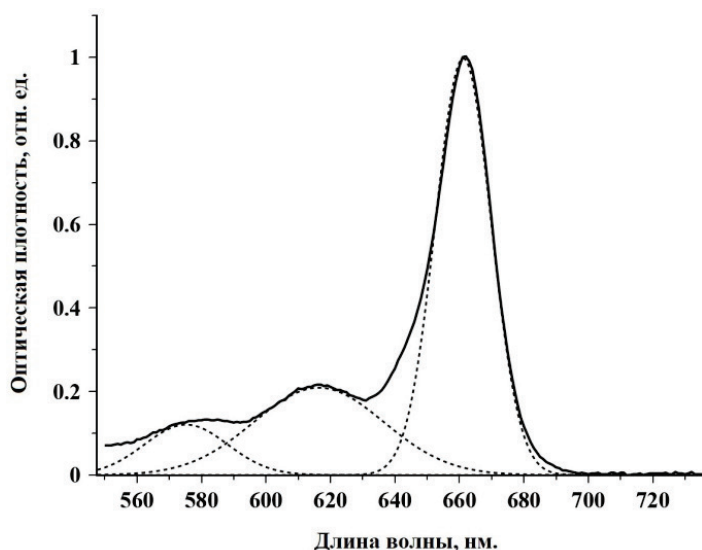


Рисунок 5. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* *Dunaliella salina* в области 550-700 нм

Таблица 3. Результаты аппроксимации

№ пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	572	15,2	0,13
2	616	23,71	0,21
3	661	10,1	0,99

Полученные в результате разложения спектров на суммы Гауссиан значения амплитуды и положения максимумов пиков, позволяют нам сделать вывод, что содержания хлорофилла *a* в *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina*, можно считать равным в пределах допустимой ошибки.

Рассмотрим нормированные спектры поглощения культур *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* в области 550-700 нм, а также определим их разность (рис. 6).

Проанализируем, полученную разность спектров используя аппроксимацию по Гауссу (рис. 7).

Результаты аппроксимации приведены в таблице 4.

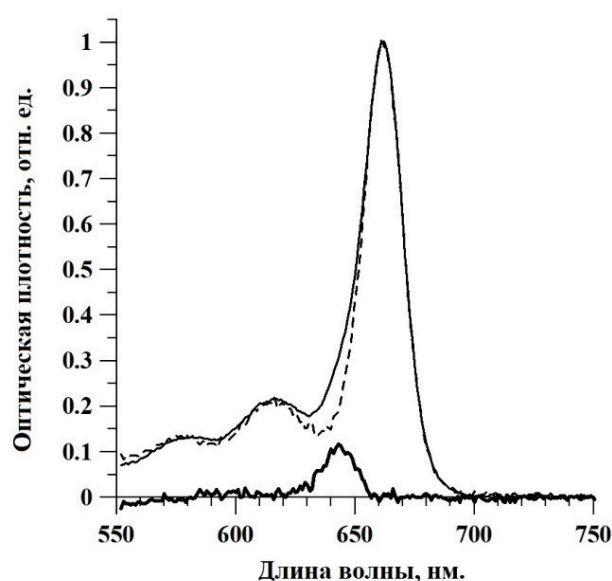


Рисунок 6. Нормированные спектры поглощения культур *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* и разность спектров в области 550-700 нм

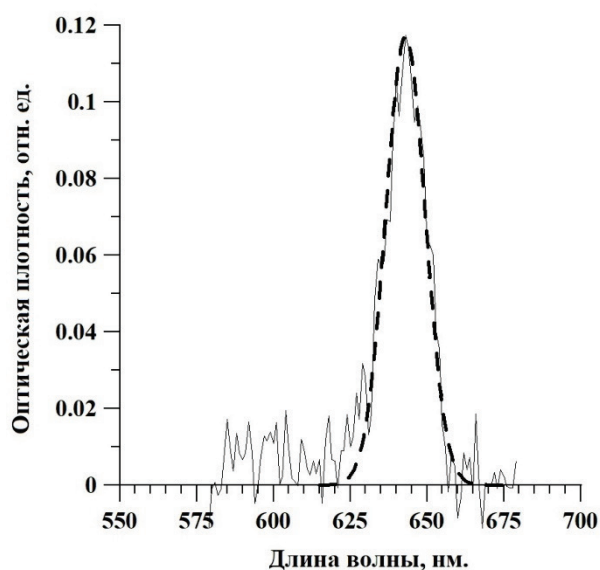


Рисунок 7. Аппроксимация разности спектров поглощения культур *Spirulina platensis* и *Dunaliella salina* в области 550-700 нм

Таблица 4. Коэффициенты модели хлорофилла *b*

Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
643	6,88	0,117

Таблица 5. Сравнение положения и амплитуды максимумов

Пигмент	Амплитуда максимума	Положение максимума, нм
Хл <i>a</i> (эксперимент)	0,99	660,16
Хл <i>b</i> (эксперимент)	0,0117	643
Хл <i>a</i> (Кюппер)	0,0585	661,7
Хл <i>b</i> (Кюппер)	0,01301	641,9

При сравнении полученных данных (табл. 5) с результатами, представленными в литературе [8], мы видим совпадения положения максимумов пиков для хлорофилла *a* и хлорофилла *b* по длине волны. Так же близкий результат получаем при сравнении отношения максимумов хлорофилла *a* и хлорофилла *b* по амплитуде. Отклонения в результате есть, но они вызваны приборной погрешностью при снятии спектра опытной культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученный результат удовлетворяет требованиям, предъявляемым к проектируемой приборной базе по точности, и позволяет обойтись минимальным значением Гауссиан.

Проведенный эксперимент, показал, что для систем автоматического контроля роста микроводорослей, в качестве логической модели мы можем использовать метод Кюппера [5], но с меньшим количеством гауссиан, что позволит в свою очередь снизить стоимость аппаратной части.

Список литературы / References:

1. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015. [Kopytov Yu.P. et al. Methodology for the complex determination of the biochemical composition of microalgae. *Algology*, 2015. (In Russ.)]
2. Сидько Ф.Я., Белянин В.Н. Рост и эффективность фотосинтеза хлореллы при прерывистом облучении. *Доклады Академии наук СССР*. Изд-во Академии наук СССР, 1976, т. 230, № 4-6, с. 998. [Sidko F.Ya., Belyanin V.N. Growth and efficiency of chlorella photosynthesis under intermittent irradiation. *Doklady of the USSR Academy of Sciences*. Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR, 1976, vol. 230, no. 4-6, pp. 998. (In Russ.)]
3. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch, 1979. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. Influence of mineral nutrition elements on the productivity of the alga *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 the absorption spectrum of the acetone extract of *Dunaliella salina*. *Actual problems of biological physics and chemistry*, 2016, no. 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. 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.

DECOMPOSITION OF THE RED AREA OF THE ABSORPTION SPECTRUM - THE INITIAL METHOD OF EVALUATING THE PIGMENTAL COMPOSITION OF MICROALGAE**Gulin A.S.¹, Trenkenshu R.P.¹, Chernyshev D.N.²**¹A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS*Nakhimov str., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: gulins_gent@mail.ru*²Sevastopol State University*Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia*

Abstract. The paper describes the choice of a logical model, as well as the stabilization mode for automatic control systems of microalgae growth. The absorption spectra of the culture and acetone extracts of the microalgae *Spirulina platensis* and *Dunaliella salina* were quantitatively described by three Gauss curves in the range from 550 to 700 nm. The normalized spectra of cultures of the microalgae *Spirulina platensis* and *Dunaliella salina* are also described, and the difference in the absorption spectra in the region of 550-700 nm is determined. Based on the results of approximating the difference in the absorption spectra of the cultures, a model of chlorophyll b was obtained. Based on the data obtained, as well as their comparison, it was concluded that this model meets the requirements for the designed instrument base.

Key words: *spirulina, chlorophyll a, absorption spectra, Gaussians, system of automatic control of microalgae growth.*

СРАВНЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ СВОЙСТВ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫХ МОЛЕКУЛ ОВОКИНИНА (2-7) И НОВОКИНИНА

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

Бакинский государственный университет

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. Молекула овокинина (2-7), аминокислотная последовательность которой является производной от участка 359-364 молекулы овальбумина, соответствует минимальной последовательности овокинина, существенно понижающей артериальное давление. В данной работе было проведено сравнительное исследование пространственного строения и конформационных свойств молекул овокинина (2-7) и его аналога новокинина методом молекулярной механики. Проведенные расчеты показали, что в слабополярной среде пептиды предпочитают формировать похожие стабильные структуры, для которых характерна вытянутая с двумя загибами конформация пептидной цепи. Было показано, что энергетически предпочтительная конформация этих пептидов стабилизируется эффективным электростатическим взаимодействием с образованием водородных связей между атомами гуанидиновой группы боковой цепи аргинина и карбоксильными группами молекул. В результате сравнительного исследования двух структурно гомологичных пептидов, овокинина (2-7) и новокинина, были определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и взаимное расположение остатков в низкоэнергетических конформациях молекул. На основе полученных параметров были составлены молекулярные модели энергетически предпочтительных конформаций овокинина (2-7) и новокинина.

Ключевые слова: овокинин (2-7) новокинин, аналог, конформация, метод молекулярной механики.

Овокинин (2-7) активный антигипертензивный пептид, состоящий из шести аминокислотных остатков: Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe. Эта последовательность, соответствующая участку 359-364 молекулы овальбумина, является минимальной последовательностью овокинина, существенно понижающей артериальное давление [1]. Было показано, что гипотензивные эффекты овокинина (2-7) были на пять порядков ниже, чем у брадикинина, нонапептида, расширяющего кровеносные сосуды и потому существенно снижающего кровяное давление [2]. Брадикинин, как известно, является природным субстратом ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), который участвует в регуляции кровяного давления. Кроме того, было показано, что овокинин (2-7) модулирует сердечно-сосудистую активность, взаимодействуя с рецепторами брадикинина B2. Как известно, осуществление и эффективность фармакологических воздействий пептидного биорегулятора, так или иначе, связаны со структурной комплементарностью, взаимодействующих пептида и рецептора. Для создания более эффективного гипотензивного пептида в работах [2-4] были проведены многоэтапные замещения аминокислотных остатков во втором, третьем, четвертом и шестом позициях молекулы овокинина (2-7). В итоге был синтезирован и протестирован гексапептид, названный новокинином [4]. Гексапептид новокинин оказался агонистом ангиотензинового рецептора AT₂, который в свою очередь играет роль модулятора эффектов ренин-ангиотензивной системы при гипертензии. В результате тестирования выяснилось, что новокинин является сильным вазодилататором и гипотензивным пептидом [4-6]. По всей видимости знание конформационных возможностей функционально активных пептидов позволит выяснить механизм их действия и вести более целенаправленный поиск новых эффективных аналогов, поскольку именно стерическое соответствие в конечном счете обеспечивает специфичность связывания с рецептором.

В данной работе было проведено исследование пространственного строения и конформационных свойств молекулы овокинина (2-7) RADHPF и его аналога новокинина RPLKPW в свободной карбоксилатной форме методом молекулярной механики. При конформационном расчете пептидов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. В работе расчет стабильных конформаций гексапептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работе [7]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [7]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов φ , ψ и ω основной цепи и χ^i , боковых цепей. Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов φ и ψ . Углы φ и ψ основной цепи в конформациях находятся из низкоэнергетических областей стерической карты: R ($\varphi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), B ($\varphi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\varphi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\varphi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных пептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов (φ и ψ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R, B и L для каждого монопептида, а для монопептида пролина конформации выбирались из двух B и R областей [7]. Отсчет двугранных углов вращения φ , ψ , ω и χ^i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [8]. Расчет стабильных конформаций пептидов

Таблица 1. Аминокислотная последовательность антигипертензивных пептидов

№	Пептид	Аминокислотная последовательность	Обозначение
1	Овокинин (2-7)	Arg – Ala – Asp – His – Pro - Phe	RADHPF
2	Новокинин	Arg – Pro – Leu – Lys – Pro - Trp	RPLKPW

проводился с помощью программы [9]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [9]. Оптимизация расчетных данных и построение молекулярных моделей на основе рассчитанных и оптимизированных величин двугранных углов конформаций молекул проводились с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0[10].

Как видно из таблицы 1 в аминокислотной последовательности гексапептидов имеются остатки пролина, которые, как известно [11], обладают конформационным своеобразием, благодаря циклическому строению в основной цепи. Остатки пролина ограничивают конформационные возможности предыдущего остатка, для которого реализуется только В форма основной цепи. Пептид овокинин (2-7) содержит один остаток пролина и поэтому для них стерически допустимо 16 структурных типа для пептидного остова. Новокинин же содержит два остатка пролина и поэтому для рассматриваемых конформеров стерически допустимы только 8 структурных типов.

Конформационное исследование гексапептида овокинина (2-7) проводилось в три этапа, в каждом из которых использовались результаты предшествующего этапа. В свою очередь, этапы делятся на ряд последовательно решаемых структурных задач. Сначала были определены оптимальные конформации три- и тетрапептидных фрагментов. Затем на основе низкоэнергетических конформаций фрагментов были рассчитаны стабильные конформации гексапептида в свободной карбоксилатной форме. В результате расчетов было показано, что в слабополярной среде пептид RADHPF предпочтительно формирует стабильную структуру, для которой характерна вытянутая с двумя загибами конформация пептидной цепи. В таблице 2 показаны энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических структурах молекулы овокинина (2-7). Самая предпочтительная конформация этого пептида стабилизируется дисперсионными и эффективным электростатическим взаимодействием с образованием водородной связи между атомами карбоксильной группы боковой цепи аспарагиновой кислоты и гуанидиновой группы боковой цепи аргинина. Данное исследование позволило определить все стабильные конформационные состояния природного гексапептида и его аналогов, сопоставление которых дает возможность выделить структурные критерии, необходимые для создания новых антигипертензивных аналогов.

Конформационный анализ структурного аналога новокинина проводился по той же схеме расчета овокинина (2-7). В результате расчетов было показано, что в слабополярной среде пептид новокинин RPLKPW предпочтительно формирует стабильную структуру, для которой характерна вытянутая с двумя загибами конформация пептидной цепи. В таблице 3 приведены энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических структурах молекулы новокинина. Предпочтительная конформация этого пептида стабилизируется эффективным электростатическим взаимодействием с образованием водородной связи между атомами карбоксильной группы С-терминальной части и гуанидиновой группы боковой цепи аргинина. Данное исследование позволило сопоставить все стабильные конформационные состояния

Таблица 2. Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в энергетически предпочтительных конформациях молекулы овокинина (2-7)

№	Конформация	E _{нев}	E _{эл}	E _{тор}	E _{общ}	E _{отн}
1	BRBBRR	-31,8	-3,2	2,6	-32,4	0
2	BRBBBB	-30,0	-1,7	2,8	-28,9	3,5
3	BRRBBB	-28,7	-1,4	3,3	-26,7	5,7
4	RRRBRR	-25,5	-0,5	2,9	-23,1	9,3
5	BRRBRR	-24,6	-1,7	4,3	-22,0	10,4
6	RRBBRR	-24,4	-1,3	4,5	-21,1	11,3
7	RBRBBB	-23,2	-1,6	4,1	-20,6	11,8
8	BBBBRR	-25,7	-0,9	6,0	-20,6	11,8
9	RRBBBB	-23,3	-0,2	3,3	-20,2	12,2
10	RBRBRR	-22,6	-1,8	4,4	-20,1	12,3
11	RRRBBB	-22,6	-1,9	4,7	-19,7	12,7
12	BBBBBB	-24,6	-0,8	5,9	-19,5	12,9
13	BBRBRR	-18,4	-3,7	3,0	-19,1	13,3
14	RBBBRR	-21,4	0,5	2,4	-18,6	13,8
15	BBRBBB	-21,1	1,2	2,6	-17,3	15,1
16	RBBBBB	-20,2	1,4	2,8	-16,0	16,4

Таблица 3. Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в энергетически предпочтительных конформациях молекулы новокинина

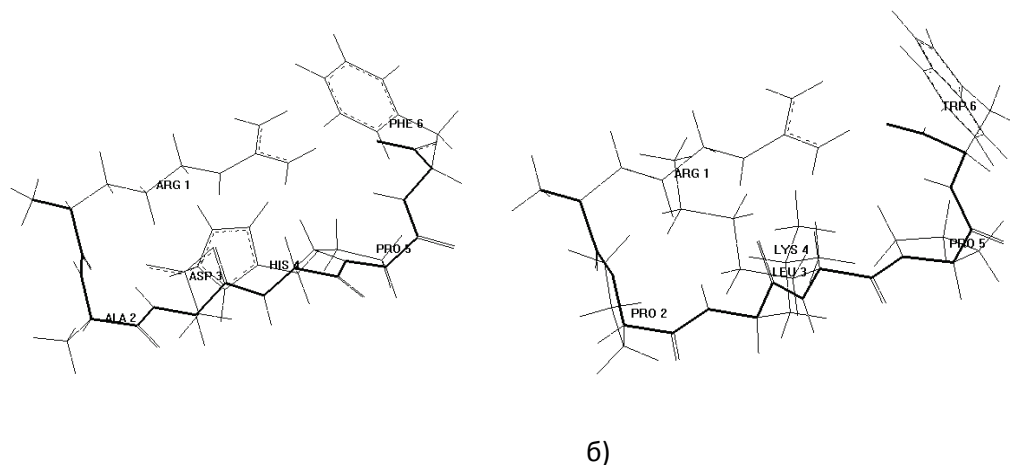
№	Конформация	$E_{\text{нев}}$	$E_{\text{эл.}}$	$E_{\text{тор.}}$	$E_{\text{общ.}}$	$E_{\text{отн.}}$
1	B RB B RR	-31,8	-3,0	2,6	-32,2	0
2	B RB B BB	-30,0	-1,5	2,8	-28,7	3,5
3	B RR B BB	-28,7	-1,2	3,3	-26,5	5,8
4	B RR B RR	-24,6	-1,7	4,3	-22,0	10,4
5	B BB B RR	-25,7	-0,9	6,0	-20,6	11,8
6	B BB B BB	-24,6	-0,8	5,9	-19,5	12,9
7	B BR B RR	-18,4	-3,7	3,0	-19,1	13,3
8	B BR B BB	-21,1	1,2	2,6	-17,3	15,1

природного гексапептида овокинина (2-7) и его аналога новокина. Из сопоставления таблиц 2 и 3 можно отметить, что обе молекулы в одной и той же среде практически реализуют одинаковый набор стабильных конформационных состояний.

В результате исследования были определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и взаимное расположение остатков в низкоэнергетических конформациях новокинина. На основе полученных параметров была составлена молекулярная модель энергетически предпочтительной конформации новокинина. На рисунке 1 приведены проекции молекулярных моделей энергетически предпочтительных конформаций овокинина (2-7) и новокинина.

Таким образом, результаты конформационного анализа антигипертензивных гексапептидов овокинина (2-7) и новокинина выявили для них одинаковую развернутую форму пептидного остова низкоэнергетических структур. Так, в слабополярной среде пептиды предпочтительно формируют похожие стабильные структуры, для которых характерна вытянутая с двумя загибами конформация пептидной цепи. Было показано, что предпочтительная конформация этих гексапептидов стабилизируется эффективным электростатическим взаимодействием с образованием водородной связи между атомами карбоксильной группы и гуанидиновой группы боковой цепи аргинина.

Итак, расчет показал, что данные гомологичные гексапептиды формируют практически идентичные пространственные конформации, различающиеся лишь ориентацией боковых цепей отдельных остатков. Полученные величины энергетических и геометрических параметров наиболее стабильных конформаций пептидов дают представление о предпочтительной пространственной структуре молекул. В результате расчетов были определены и сопоставлены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформационных состояниях молекул. Предполагается, что среди рассчитанных низкоэнергетических структур находится биологически активная конформация антигипертензивных гексапептидов. В результате сравнительного исследования двух структурно гомологичных пептидов, овокинина (2-7) и новокинина, были определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и взаимное расположение остатков в низкоэнергетических конформациях молекул. На основе полученных параметров были составлены молекулярные модели энергетически предпочтительных конформаций овокинина (2-7) и новокинина. Данное исследование позволило определить все стабильные конформационные состояния двух гексапептидных пептидов, сопоставление которых дает возможность выделить структурные критерии, возможно необходимые для создания лекарственных препаратов пригодных для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

**Рисунок 1.** Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур а) овокинина (2-7) и б) новокинина, соответственно. Жирной линией указан пептидный остов молекул

Список литературы / References:

1. Matoba N., Usui H., Fujita H., Yoshikawa M. A novel antihypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxidemediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett*, 1999, vol. 452, no. 3, pp. 181-184.
2. Matoba N., Kamada Y., Usui H., Nakagiri R., Yoshikawa M. Designing Potent derivatives of Ovokinin (2-7), an Antihypertensive Peptide Derived from Ovalbumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2001, vol. 65, no. 3, pp. 736-739.
3. Yamada Y., Matoba N., Usui H., Onishi K., Yoshikawa M. Design of a Highly Potent Anti-hypertensive Peptide Based on Ovokinin (2-7). *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2002, vol. 66, no. 6, pp. 1213-1217.
4. Yamada Y., Yamauchi D., Usui H., Zhao H., Yokoo M., Ohinata K., Iwai M., Horiuchi M., Yoshikawa M. Hypotensive activity of novokinin, a potent analogue of ovokinin (2-7), is mediated by angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin IP receptor. *Peptides*, 2008, vol. 29, no. 3, pp. 412-418.
5. Yoshikawa M., Ohinata K., Yamada Y. The pharmacological effects of novokinin; a designed peptide agonist of the angiotensin AT2 receptor. *Curr Pharm Des.*, 2013, vol. 19, no. 17, pp. 3009-3012.
6. Yamada Y., Yamauchi D., Yokoo M., Ohinata K., Usui H., Yoshikawa M. A potent hypotensive peptide, novokinin, induces relaxation by AT2- and IP-receptor-dependent mechanism in the mesenteric artery from SHR. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 2008, vol. 72, no. 1, pp. 257-259.
7. Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М., Особенности пространственной организации молекул гемокинина-1 человека и гемокинина-1 мыши/крысы. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 3, с. 457-470. [Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godzhaev N.M., Features of spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Biofizika*, 2015, vol. 60, iss. 3, pp. 457-470. (In Russ.)]
8. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148. [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godzhaev N.M. Program for semi-empirical calculation of conformations of molecular complexes on a computer. *Journal of Structural Chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148. (In Russ.)]
9. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.
10. Chem 3D Pro, "Molecular Modeling and Analysis". *Cambridge Soft Corporation*, 2005, vol. 875, p. 02139.
11. Schimmel P.R., Flory P.J., Conformational energies and conformational statistics of copolypeptides containing L-proline. *J. Mol. Biol.*, 1968, vol. 34, pp. 105-111.

**COMPARISON OF CONFORMATIONAL PROPERTIES OF ANTIHYPERTENSIVE MOLECULES
OVOKININ (2-7) AND NOVOKININ****Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godjaev N.M.***Baku State University, Z.Khalilov str., 23, Baku, Azerbaijan, Az1148; e-mail: gulshen@mail.ru*

Abstract. The molecule ovokinin (2-7), aminoacid sequence which is derived by area 359-364 molecules ovalbumin, corresponds to the minimum sequence ovokinin, greatly lowering arterial pressure. In given work was organized comparative study of the spatial construction and conformational characteristic of the molecules ovokinin (2-7) and novokinin by method molecular mechanics method. The results of calculation have shown that in weak-polar environment these peptides preferably form the similar stable structures, for which typical extending structure with two turns of peptide chain. There was is shown that energy preferred conformation of these peptide is stabilized by efficient electrostatic interactions with forming the hydrogen bonds between atoms of guanidine groups of side chain of arginine and carboxilate groups of molecules. As a result of comparative study of two structured similar peptides, ovokinin (2-7) and novokinin, were determined the energy preferred areas of the values of dihedral angles and orientations of residues in low-energy conformations of molecules. On base of obtained geometric parameters were formed molecular models of energy preferred conformations of ovokinin (2-7) and novokinin.

Key words: antihypertensive peptide, ovokinin (2-7), novokinin, conformation, molecular mechanics method.

СТРУКТУРНЫЕ И КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФРАГМЕНТОВ МОЛЕКУЛЫ ГИЛАМБАТИНА

Агаева Г.А., Сеферли Г.Р., Годжаев Н.М.

Бакинский государственный университет

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. Молекула гиламбатина по своим структурным особенностям и функциональным действиям относится к тахикининовым нейропептидам. Расчет стабильных конформационных состояний фрагментов молекулы позволил определить локальные элементы вторичной структуры и энергетически предпочтительную взаимную ориентацию остатков в стабильных конформационных состояниях фрагментов. В полученных стабильных конформационных состояниях фрагментов были уточнены и энергетически оценены взаимовыгодные взаимодействия боковых цепей остатков и водородные связи. Расчет показал, что С-концевой пентапептид молекулы энергетически предпочтительно формирует алфа-спиральную конформацию, стабилизированную образованием водородных связей между атомами концевых групп. На основе рассчитанных значений двугранных углов были построены визуальные модели энергетически предпочтительных конформационных состояний исследуемых участков молекулы гиламбатина.

Ключевые слова: гиламбатин, тахикинин, фрагмент, конформация, метод молекулярной механики.

Гиламбатин состоит из двенадцати аминокислотных остатков и впервые был выделен из кожи африканской лягушки *Hylambates maculatus* [1]. Однако в отличие от других тахикининов, гиламбатин обладает остатком метионилметионина на С-конце, а не С-концевым трипептидом -Gly-Leu-Met-NH₂, который до сих пор был характерной особенностью всех членов семейства тахикининов. Кроме того, было показано, что вводимый внутривенно гиламбатин значительно повышает уровень глюкозы и инсулина в плазме крови, но на секрецию глюкагона то не влияет [1]. Этот механизм действия не наблюдается у других тахикининовых нейропептидов и тем самым если в ткани млекопитающих присутствует гиламбатин, то, он может играть существенную роль в регуляции углеводного обмена. Молекула гиламбатина оказалась более активной по отношению к тахикининовым рецепторам NK1 и NK2, чем другие тахикинины. В работе [2] было проведено исследование структурно-функциональных взаимосвязей 12 фрагментов гиламбатина на сократительную активность гладкой мускулатуры. Была установлено, все фрагменты С-концевой части молекулы в той или иной степени проявляют данную активность нативной молекулы. Поэтому создание высокоактивных антагонистов рецепторов NK1 и NK2 на основе гиламбатина позволит блокировать или стимулировать его физиологические воздействия в лечении ряда заболеваний.

В данной работе было проведено исследование конформационных свойств отдельных фрагментов молекулы гиламбатина, методом молекулярной механики. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работах [4,5].

При расчете стабильных конформаций фрагментов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. Параметризация потенциальных функций была аппроксимирована к условиям полярной среды: величина диэлектрической проницаемости принята равной 10 [5], а водородные связи предполагались ослабленными (максимальная энергия при $r_0=1,8$ Å составляла -1,5 ккал/моль. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работах [4, 5].

При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [5]. Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных пептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов (ϕ и ψ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R,B,L и P для каждого монопептида. Для всех неглициновых монопептидов варианты составлялись из R, B и L областей.

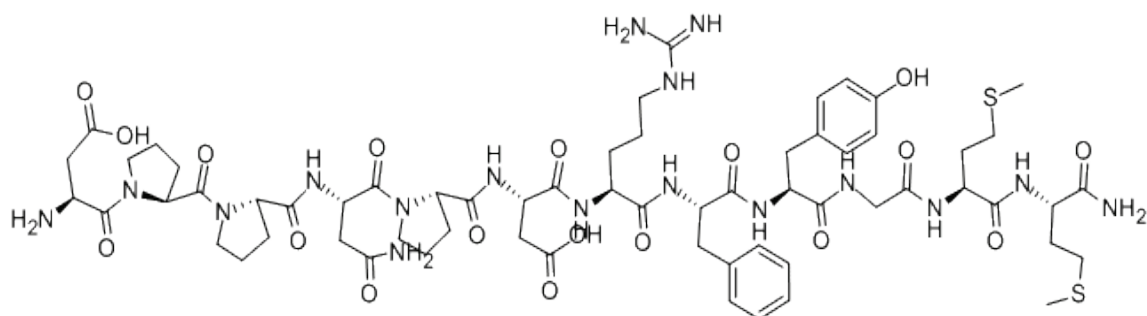


Рисунок 1. Первичная структура тахикининового пептида гиламбатина DPPDPNRFYGMMAмид

Таблица 1. Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях дипептида L-Met-L-Met

Шейп	Конформация	Энергетические параметры, ккал/моль				
		Е _{нев}	Е _{эл.}	Е _{тор.}	Е _{общ.}	Е _{отн.}
f	R ₂₂ R ₃₂	-6,8	1,5	0,6	-4,6	0
	R ₁₂ R ₃₂	-5,0	0,9	0,6	-3,8	0,8
	R ₃₁ R ₃₁	-4,9	1,3	0,1	-3,6	1,0
	R ₃₂ R ₁₂	-5,6	1,5	0,2	-3,0	1,6
	B ₂₁ L ₃₂	-4,3	0,9	1,6	-2,2	2,4
e	B ₂₁ B ₂₁	-5,9	0,8	0,6	-4,3	0,3
	B ₃₃ B ₃₂	-5,3	0,9	0,5	-3,9	0,7
	B ₂₂ B ₃₂	-5,1	0,8	0,5	-3,7	0,8
	B ₂₂ B ₂₂	-5,0	0,9	0,5	-3,5	1,1
	L ₂₃ B ₂₃	-4,3	0,9	1,0	-2,3	2,3
	L ₂₁ B ₁₂	-4,4	1,4	0,9	-2,0	2,6

Конформационное исследование фрагментов гиламбатина проводилось на основе низкоэнергетических структур, составляющих его свободных монопептидов. Начальные структурные варианты для расчета оптимальных конформаций составлялись с учетом всех возможных для фрагмента шейпов. При выборе вариантов боковые цепи остатков пептида варьировались таким образом, чтобы создать максимальное количество, стабилизирующих структуру, межостаточных взаимодействий. Для определения оптимальных конформаций составлялись соответствующие структурные варианты. В таблице 1 приведены энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в стабильных конформациях оригинального дипептида L-Met-L-Met в двух возможных шейпах- e-развернутом и f- свернутом формах. Как видно данный дипептид одинаково стабильно формирует оба шейпа пептидной цепи. Расчет конформаций С-концевого пентапептида Phe-Туг-Gly-Met-Met показал, что самая низкоэнергетическая конформация фрагмента формирует один виток правой α -спирали, стабилизированной внутримолекулярной водородной связью между Н-атомом, связанным с электроотрицательным атомом азота пептидной цепи первого остатка и атомом кислорода карбонильной группы пятого по счету остатка. В таблице 2 представлены энергетические вклады различных внутримолекулярных взаимодействий в оптимальных конформациях С-концевого пентапептида гиламбатина. В интервал относительной энергии 0-5 ккал/моль кроме α -спиральных структур попадают также конформации двух типов, которые также характеризуются образованием стабильных ди- и трипептидных межостаточных взаимодействий. Во всех низкоэнергетических конформациях молекулы пентапептида основополагающий стабилизирующий вклад вносят невалентные взаимодействия, а электростатические взаимодействия, из-за наличия гидрофобных остатков, вносят незначительный вклад. Наличие в пентапептиде остатков с громоздкими циклическими боковыми цепями таких как Туг и Phe, способствует образованию эффективных межостаточных взаимодействий в большинстве конформаций фрагмента. На основе рассчитанных значений двугранных углов были построены визуальные модели энергетически предпочтительных конформационных состояний исследуемых участков молекулы гиламбатина. На рисунке 1 показана молекулярная модель альфа-спирального витка С-концевого пентапептида гиламбатина.

Таблица 2. Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях С-концевого пентапептида гиламбатина

№	Конформация	Энергетические параметры, ккал/моль				
		Е _{нев}	Е _{эл.}	Е _{тор.}	Е _{общ.}	Е _{отн.}
1	R ₂ R ₃ RR ₂₁ R ₃₂	-22,9	4,0	3,0	-16,6	0
2	B ₂ R ₂ RR ₂₁ R ₃₂	-22,7	4,5	4,8	-13,4	3,2
3	R ₂ B ₂ PB ₂₂ B ₂₂	-18,3	3,7	2,3	-12,4	4,2
4	B ₂ B ₃ BB ₂₁ B ₂₁	-15,8	3,7	1,6	-10,5	6,1
5	B ₂ B ₃ RB ₂₁ B ₂₁	-15,7	4,0	1,4	-10,3	6,3
6	B ₂ B ₁ BB ₂₁ R ₂₂	-16,8	3,8	3,1	-9,9	6,7
7	R ₂ B ₁ PL ₃₂ B ₃₂	-15,6	3,8	2,2	-9,7	6,9
8	R ₂ B ₁ LB ₂₂ R ₂₂	-14,5	4,0	1,5	-9,0	7,6
9	B ₂ B ₂ LR ₂₂ B ₂₂	-14,2	3,9	1,4	-8,8	7,8
10	B ₂ B ₂ PL ₂₂ B ₃₂	-13,3	4,0	1,8	-7,7	8,9
11	R ₂ B ₁ BR ₂₁ B ₁₂	-16,8	4,1	2,6	-7,0	9,6
12	R ₂ B ₁ BB ₂₂ B ₂₂	-15,4	3,7	5,5	-6,1	10,5

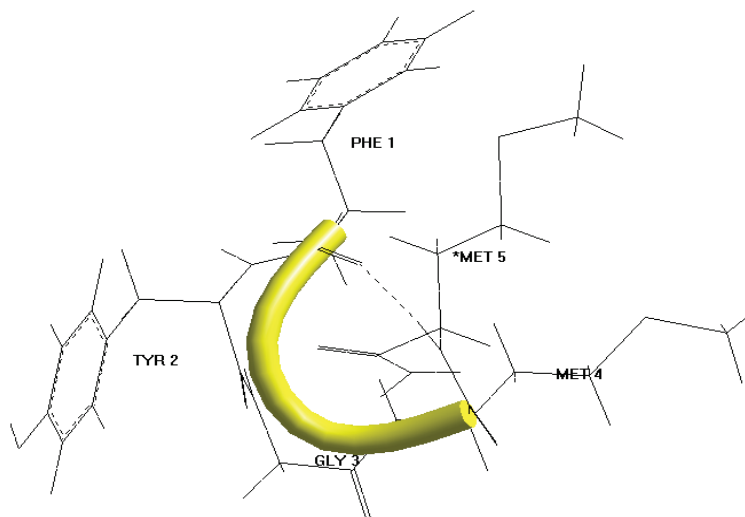


Рисунок 1. Молекулярная модель энергетически наиболее предпочтительной пространственной структуры С-концевого пентапептида. Желтой линией указан пептидный остов молекулы

Таким образом, можно предположить, что С-концевой пентапептид Phe-Tyr-Gly-Met-Met самопроизвольно принимает α -спиральную конформацию, поскольку из всех возможных форм именно эта форма является наиболее стабильной, т.е. обладает наименьшей внутримолекулярной энергией. При образовании этой конформации ни одна из боковых цепей остатков, входящих в аминокислотную последовательность, не вносит стерических затруднений. Именно α -спиральная конформация благоприятствует образованию эффективных ди-, три- и тетрапептидных межостаточных взаимодействий.

Расчет стабильных конформационных состояний фрагментов молекулы гиламбатина позволил определить локальные сегменты вторичной структуры и энергетически предпочтительную взаимную ориентацию остатков в стабильных конформационных состояниях фрагментов. В полученных стабильных конформационных состояниях были уточнены и энергетически оценены взаимовыгодные взаимодействия боковых цепей остатков и водородные связи

Список литературы / References:

1. Güllner H.G., Harris V., Yajima H., Unger R.H., Hylambatin, a structurally unique tachykinin: effects on insulin and glucagon secretion. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 1984, vol. 272, no. 2, pp. 304-309.
2. Inoue A., Fukuyasu T., Nakata Y., Yajima H., Nomizu M., Inagaki Y., Asano K., Segawa T. Structure-activity relationship of hylambatin and its fragments as studied in the guinea-pig ileum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1988, vol. 40, iss. 1, pp. 72-73.
3. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M., The program for semiempirical calculation of conformations of the molecular complexes *J. Struct. Khim.*, 1983, vol. 24, pp. 147-148.
4. Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godjaev N.M., The spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 365-377.

THE STRUCTURAL AND CONFORMATIONAL PARTICULARITIES OF FRAGMENTS OF HYLAMBATIN MOLECULE

Agaeva G.A., Seferli G.R., Godjaev N.M.

Baku State University, Z.Khalilov str., 23, Baku, Azerbaijan, Az1148; e-mail: gulshen@mail.ru

Abstract. The molecule hylambatin on its structured particularities and physiologic functions pertains to tachykinin neuropeptides. The molecule hylambatin on its structured particularities and physiologic functions pertains to tachykinin neuropeptides. The spatial structure and conformational properties of some fragments of hylambatin tachykinin peptide have been investigated by molecular mechanics method. It is known that this molecule has different dipeptide segment L-Met-L-Met at the C-terminus in change from tachykinins. As results of given investigation were determined the conformational properties of some dipeptide, tripeptide, tetrapeptide and pentapeptide fragments of hylambatin. The calculation of stable conformational states of fragments of the molecule has allowed to define the local elements of the secondary structure and energy preferred mutual orientation of residues in stable structures. Calculations showed that C-terminal pentapeptide of hylambatin molecule preferentially adopt the alpha-helical conformation, stabilized by hydrogen bonds between the end groups of molecule. On the base of calculated values of dihedral angles of stable conformations of fragments have been constructed their molecular models.

Key words: hylambatin, tachykinin, fragment, conformation, molecular mechanics method.

МАКСИМАЛЬНАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ *PORPHYRIDIVM PURPUREUM* И *ARTHROSPIRA PLATENSIS* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОСВЕЩЁННОСТИ

Лелеков А.С.¹, Ключкова В.С.², Гаджи А.В.²

¹ ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Россия; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viki-iki@mail.ru

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. В работе проведено сравнение скоростей роста красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* и цианобактерии *Arthrospira platensis* при различных значениях поверхностной облучённости для линейного участка накопительной кривой. Значения освещённости, измеряемые в клк, переведены в величины облучённости (энергии ФАР) с учётом спектра излучения используемых люминесцентных ламп. Определены величины максимальной продуктивности на линейном участке накопительных кривых. Для *P. purpureum* наибольшее значение данного параметра составило 0,62 г/(л·сут) при поверхностной освещённости 15 клк, а для *A. platensis* – 0,28 г/(л·сут) при 8,3 клк. Исследована зависимость максимальной продуктивности от облучённости, рассчитаны значения тангенса угла наклона линейной регрессии, величина которого составила 0,1 для *P. purpureum* и 0,2 для *A. platensis*. Показано, что зависимость коэффициента поглощения от плотности культуры для обоих видов описывается с высокой точностью ($R^2 = 0,99$) уравнением Бугера-Ламберта-Бера. Определён удельный коэффициент экстинкции, который составил 0,08 и 0,14 для *P. purpureum* и *A. platensis* соответственно. Предложена модель зависимости удельной скорости роста культуры микроводорослей от её биомассы, основанная на положении о том, что удельная скорость синтеза прямопропорциональна количеству поглощённой световой энергии. Верификация модели показала высокое соответствие ($R^2 = 0,98$) с экспериментальными данными.

Ключевые слова: линейная фаза роста, максимальная продуктивность, удельная скорость роста, облучённость, коэффициент поглощения света, удельный коэффициент экстинкции.

Благодаря простоте технической реализации и эффективности накопительный режим культивирования является оптимальным способом выращивания микроводорослей. В условиях накопительного культивирования исследователи отмечают наличие линейной фазы, характеризующейся постоянством продуктивности. Этот участок имеет относительно большую протяжённость во времени, а плотность культуры иногда увеличивается в десятки раз. Для низших фотоавтотрофов механизмы линейного роста в литературе не описываются. В некоторых работах его связывают с газовым обеспечением, либо световыми условиями, то есть с факторами, которые приводят к кажущемуся постоянству скорости роста [1]. Независимо от механизма, обеспечивающего линейный рост, параметр продуктивности культуры микроводорослей можно рассматривать как обобщённую характеристику её физиологического состояния, так как он включает в себя всю совокупность биосинтетических и биоконверсионных процессов в клетках. Постоянство скорости роста позволяет относительно простыми способами управлять биохимическим составом получаемой биомассы в довольно широком диапазоне. Это свойство очень удобно в практическом плане, т. к. без потери продуктивности можно выбрать такую плотность непрерывной культуры, при которой на выходе будет получена биомасса с заданным биохимическим составом.

Световые условия, в которых находятся микроводоросли, первоочередно влияют на все процессы, которые протекают в клетках, так как свет является единственным источником энергии для роста и биосинтеза. В процессе фотосинтеза поглощённая энергия ФАР запасается клетками микроводорослей в виде макроэргов АТФ и НАДФ·Н. Современные представления о нециклическом транспорте электронов сводятся к общепринятой Z-схеме [2]. В результате циклического переноса электронов происходит синтез добавочного количества АТФ, необходимого для нормальной работы цикла Кальвина и протекания последующих биосинтетических процессов. Основным продуктом цикла Кальвина являются фосфорилированные гексозы. Промежуточное соединение цикла C_3 -фосфоглицериновая кислота может превращаться в пировиноградную кислоту при недостатке НАДФ·Н, и далее в аланин. Наряду с аминокислотами, при определённых условиях, продуктами цикла Кальвина могут являться органические кислоты, жиры, липиды [3].

При любом лимитирующем факторе (минеральном или энергетическом) продуктивность культуры будет напрямую связана со скоростью энергообмена, причём результирующая скорость роста определяется минимальной величиной скорости энергообмена, которая, в свою очередь, зависит от наименьшего из потоков минерального и светового питания [4]. При минеральном дефиците скорость энергообмена будет ограничена скоростью окисления макроэргов, при световом лимитировании – скоростью их восстановления. При полном минеральном обеспечении и прочих оптимальных значениях внешней среды скорость образования макроэргов, а, следовательно, максимальная продуктивность будут определяться скоростью поглощения фотонов и количеством квантов, необходимых для восстановления одной молекулы макроэрга [5]. Однако скорость роста

увеличивается с ростом освещённости до некоторого предела и ограничена максимальным значением, которое определяется внутренней структурой клеток микроводорослей (узким местом). В этом случае максимальная скорость синтеза биомассы будет пропорциональна общему количеству ключевого фермента (или переносчика) и максимальной эффективности преобразования энергии макроэргов в химическую энергию, запасённую в биомассе. Оценка данных параметров для различных видов микроводорослей позволит получить новые знания о механизмах светового ограничения скорости роста в культуре.

Цель работы – исследование зависимости максимальной продуктивности накопительных культур *P. purpureum* и *A. platensis* от внешней освещённости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе кафедры “Физика” СевГУ, а также в отделе биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ им. А. О. Ковалевского РАН г. Севастополь. Культуру порфиридиума *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew & Ross (1965), полученную из ЦКП “Коллекция гидробионтов Мирового океана” ФИЦ ИнБЮМ, выращивали на среде для красных морских микроводорослей [6] с добавлением 10 г/л поваренной соли для повышения общей солёности. Культуру спироулы *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler (1932), выращивали на среде «Zarrouk» [7] (для приготовления среды используется дистиллированная вода). Культивирование осуществляли в накопительном режиме в плоскопараллельном фотобиореакторе [8] толщиной 2 см, с рабочим объёмом 1 л, площадью освещаемой поверхности 0,05 м² при круглосуточном искусственном освещении люминесцентными лампами Philips Daylight 54-765. Сверху культиватор закрывался пластиковой крышкой, в которой было выполнено отверстие для подачи воздуха, а также был оснащён системой охлаждения («водяной рубашкой»), обеспечивающей поддержание температуры суспензии 26-28 °С. Среднюю освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116 по шести точкам.

В эксперименте проводилось измерение температуры, оптической плотности культуры микроводорослей, а также сухой биомассы. Перед отбором проб объём в фотобиореакторе доводили дистиллированной водой до начального, компенсируя испарение. Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в фотобиореакторе, абсолютная погрешность измерений составляла 0,5 °С. Отбор проб для определения оптической плотности проводили с помощью дозатора Biohit 1-5 мл с разных точек внутри фотобиореактора: отбирали по 5 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 30 мл. В средней пробе после перемешивания определяли коэффициент пропускания. Оптическую плотность определяли на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм. Для определения сухого веса (СВ) величину оптической плотности D_{750} умножали на эмпирический коэффициент $k = 1,4 \text{ г} \cdot \text{СВ} \text{ л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$ для *P. purpureum* и $k = 0,8 \text{ г} \cdot \text{СВ} \text{ л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$ для *A. platensis* [9, 10]. Измерения проводили относительно дистиллированной воды. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить погрешность измерения оптической плотности культуры, связанную с светорассеянием. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (от 30 до 70 % пропускания), проба разбавлялась дистиллированной водой. Спектр излучения люминесцентных ламп получен при помощи спектроколориметра ТКА-ВД/02.

Фотометрические величины освещённости, перевели в энергетические единицы облучённости освещаемой поверхности фотобиореактора согласно формуле [11]:

$$E = 1,464 \cdot N \cdot E_0, \quad (1)$$

где E – облучённость, Вт/м², E_0 – освещённость поверхности культиватора, клк, N – соотношение полной и видимой люксметром энергии ФАР.

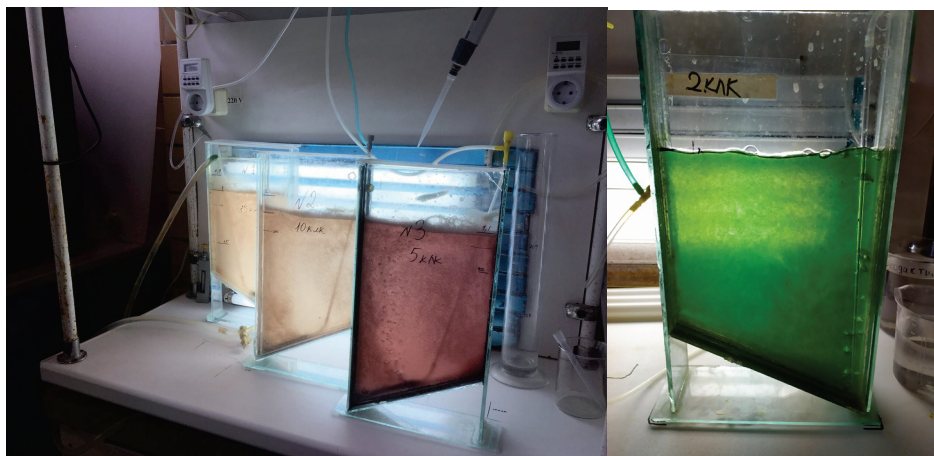


Рисунок 1. Внешний вид лабораторных установок

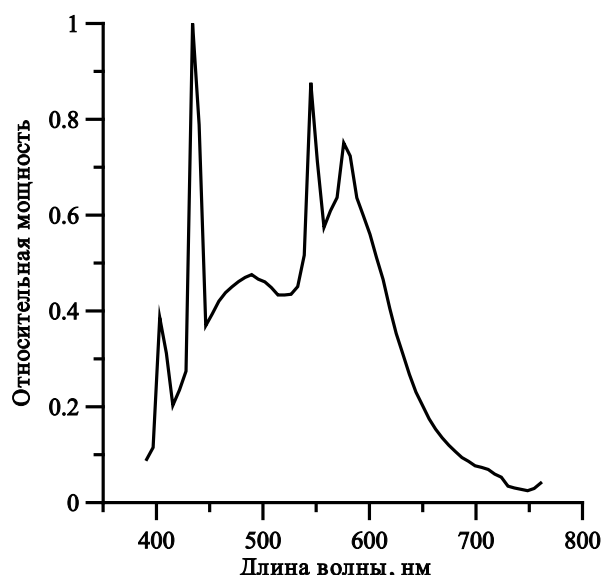


Рисунок 2. Энергетический спектр излучения люминесцентной лампы Philips Daylight-54-765

Для расчёта величины N , согласно методике [11], была сделана таблица с 2-мя колонками. В первую колонку были внесены значения длин волн λ от 400 до 800 нм. Во вторую колонку были внесены величины излучаемой источником света энергии, соответствующие этим длинам волн $\Phi(\lambda)$, которые были получены в результате оцифровки графика энергетического спектра излучения люминесцентной лампы Philips Daylight-54-765 (рис. 2) в программе Grafula. Далее добавлена колонка со значениями относительной спектральной световой эффективности $V(\lambda)$ (относительной видности), которые соответствуют спектру поглощения люксметра Ю-116. Данные были интерполированы в программе SciDavis с шагом 1 нм. Затем, перемножив значения излучаемой энергии $\Phi(\lambda) \cdot V(\lambda)$, получили долю энергии, регистрируемой люксметром. Результаты представлены в таблице 1.

Просуммировав все значения $\Phi(\lambda)$ и $\Phi(\lambda) \cdot V(\lambda)$, рассчитаем N по формуле:

$$N = \frac{\sum_{400}^{800} \Phi(\lambda)}{\sum_{400}^{800} \Phi(\lambda) \cdot V(\lambda)} = 2.32 \quad (2)$$

Далее, подставляя полученное значение N и величин освещённости, попадающие на рабочую поверхность культиватора площадью 0,05 м², в формулу (1), была найдена облучённость E в Вт/м².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе эксперимента получены накопительные кривые роста микроводорослей *P. purpureum* и *A. platensis*, представленные на рисунке 3.

Таблица 1. Излучаемая энергия $\Phi(\lambda)$, относительная видность $V(\lambda)$ и спектр видности лампы $\Phi(\lambda) \cdot V(\lambda)$ при некоторых длинах волн

λ , нм	$\Phi(\lambda)$	$V(\lambda)$	$\Phi(\lambda) \cdot V(\lambda)$
400	2,66	0,0004	0,00106
401	4,50	0,0005	0,00216
402	5,76	0,0006	0,00323
...	...	...	...
600	12,46	0,63	7,86
601	12,33	0,62	7,62
602	12,20	0,61	7,38
...	...	...	...
768	0,53	0,00002	$1,1 \cdot 10^{-5}$
769	0,53	0,00001	$5,3 \cdot 10^{-6}$
770	0,53	0	0

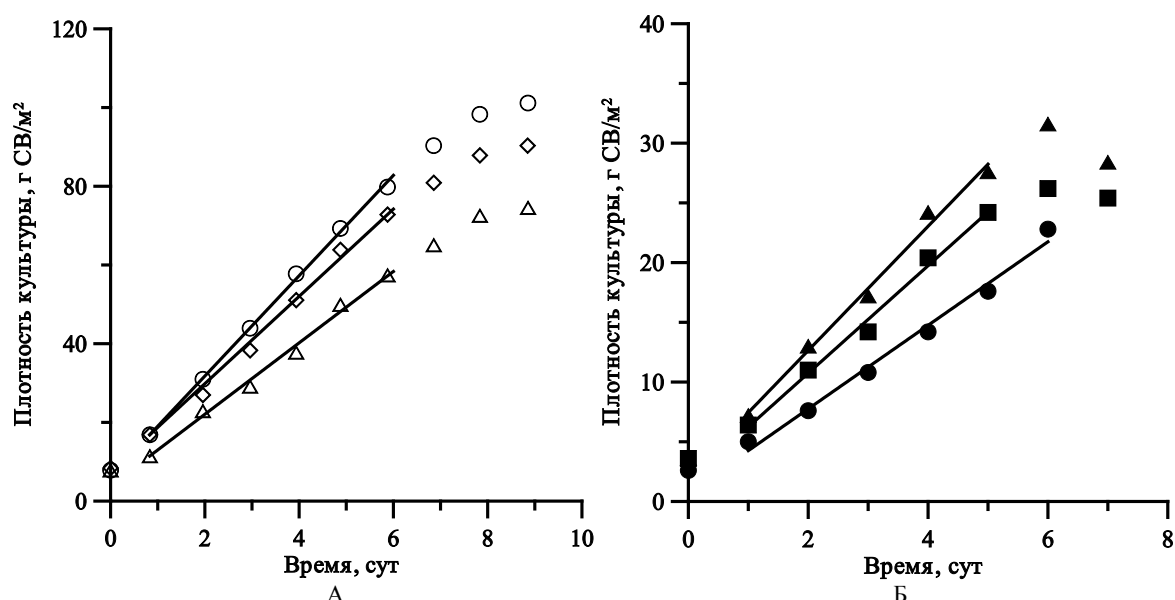


Рисунок 3. А – Накопительные кривые роста *P. purpureum*: ○ – 15 клк; ◇ – 10 клк; △ – 5 клк. Б – некоторые кривые роста *A. platensis*: ▲ – 8,3 клк; ■ – 6,5 клк; ● – 4,5 клк

Для определения максимальной продуктивности P_m на каждом из графиков провели аппроксимацию линейного участка роста уравнением:

$$B = B_0 + P_m \cdot t, \quad (3)$$

где B_0 – начальная плотность культуры.

Значения максимальной продуктивности представлены в г/(л·сут) и с учётом толщины культиватора в г/(м²·сут). Полученные данные представлены в таблице 2.

Из таблицы можно сделать вывод, что максимальное значение продуктивности у *P. purpureum* достигает 12,4 г/(м²·сут) при облучённости 51 Вт/м², а у *A. platensis* максимальная продуктивность 5,6 г/(м²·сут) при 28,1 Вт/м². Согласно литературным данным [12], насыщающая облучённость, при которой удельная скорость роста достигает максимума, составляет около 50 и 100 Вт/м² для *P. purpureum* и *A. platensis*. Следовательно, для порфиридиума поверхностная облучённость в эксперименте была близка к насыщающей, в то время как для спирулины данная величина составляла около 30 % от насыщающей облучённости. Тем не менее, даже для *A. platensis* максимальная удельная скорость роста составила 0,04 ч⁻¹, что в двое меньше, чем указано в [12]. Отметим, что максимальные скорости 0,08 – 0,09 ч⁻¹ могут быть реализованы только при условии стабилизации биохимического состава клеток в плотностате. Для накопительной культуры с ростом плотности микроводорослей происходит изменение пигментного и биохимического состава клеток. Эти изменения вызваны метаболическим [13], либо энергетическим лимитированием продуктивности [14].

Согласно классическим модельным представлениям, величина максимальной продуктивности культуры связана с поверхностной освещённостью или концентрацией биогенных элементов в среде и может быть описана гиперболической зависимостью по уравнению Моно [15]. В случае лимитирования роста микроводорослей пластическим субстратом, наблюдается высокое соответствие модели Моно с экспериментальными данными [9]. Результаты, полученные в данной работе для обоих видов для линейной фазы роста, с более высокой точностью описываются линейным сплайном. Согласно расчётам (см. рис. 4), тангенс угла наклона прямой составляет 0,1 для *P. purpureum* и 0,2 для *A. platensis*. Эти коэффициенты являются обобщёнными параметрами, указывающими на отличия способности различных видов микроводорослей усваивать световую энергию. Согласно предложенным ранее базовым принципам моделирования роста культур микроводорослей [5], скорость синтеза биомассы, выраженная в нормированном виде, прямолинейно зависит от количества квантов света, поступающих на одну молекулу ключевого комплекса за время его оборота. При этом коэффициент пропорциональности связан

Таблица 2. Максимальная продуктивность исследуемых объектов при разных значениях облучённости

	<i>P. purpureum</i>			<i>A. platensis</i>						
Е, Вт/м²	17,0	34,0	51	6,1	10,9	15,6	20,4	22,1	25,0	28,1
P_m , г/(л·сут)	0,45	0,55	0,62	0,05	0,09	0,14	0,21	0,23	0,25	0,28
P_m г/(м²·сут)	9,0	11,0	12,4	1,0	1,8	2,8	4,2	4,6	5,0	5,6

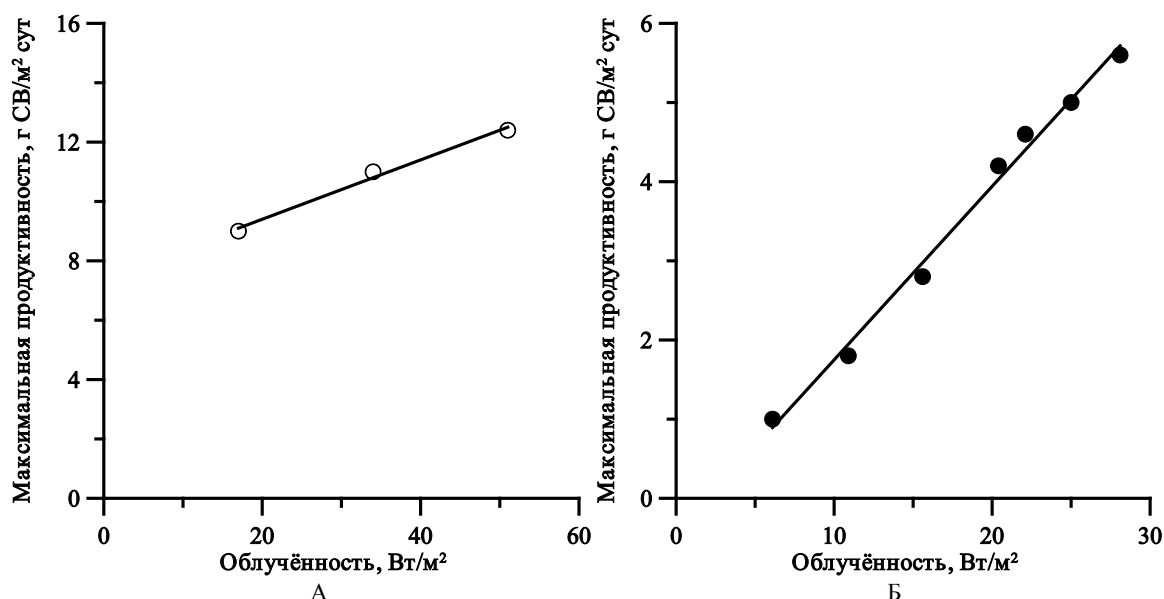


Рисунок 4. Линейная зависимость максимальной продуктивности культуры *P. purpureum* (А) и *A. platensis* (Б) от облучённости для линейной фазы накопительной кривой

с калорийностью биомассы, коэффициентом поглощения и эффективностью усвоения световой энергии и др. Полученные значения тангенсов угла наклона для двух видов микроводорослей, относящихся к различным систематическим группам низших фотоавтотрофов, могут быть использованы при разработке теоретических основ роста плотных культур.

Величина максимальной продуктивности не может являться независимым параметром для характеристики роста, т.к. зависит от количества биомассы. Подобного недостатка лишена удельная скорость роста. Для линейного участка зависимость удельной скорости роста от плотности культуры определяется выражением:

$$\mu = \frac{P_m}{B} \quad (4)$$

Подставив значения максимальной продуктивности из таблицы 3 и значения плотности культуры, соответствующие каждой величине облучённости, в формулу (4), получим динамику изменения удельной скорости. Гиперболическое снижение удельной скорости обусловлено тем, что при увеличении концентрации клеток в фотобиореакторе происходит затенение одних клеток другими, что приводит к уменьшению количества поглощаемой световой энергии на клетку. Учитывая то, что используемая питательная среда в обоих случаях обеспечивает рост биомассы микроводорослей не менее чем до 4 г СВ/л, на выбранном диапазоне плотностей элементы минерального питания и газовое обеспечение не являются лимитирующим фактором. Таким образом, удельная скорость роста будет определяться поверхностной освещённостью культуры, её оптической плотностью и коэффициентом поглощения света. В свою очередь оптические свойства культуры зависят от спектральных свойств источника света и концентрации пигментов в клетках. При моделировании светозависимого роста культуры микроводорослей удобно использовать параметр среднепространственной облучённости [12], физический смысл которой состоит в количестве световой энергии, приходящейся на единицу хлорофилла а. С учётом разработанных ранее теоретических представлений [5], можно считать, что величина удельной скорости синтеза биомассы прямопропорциональна E_{cp} . Наблюдаемая удельная скорость роста равна разности скоростей синтеза и эндогенного расхода биомассы. При условии того, что изменение содержания хлорофилла в клетках незначительное, то можно использовать ранее предложенную модель, которая позволяет описать зависимость удельной скорости роста от плотности культуры [1]:

$$\mu = \frac{\alpha \cdot I_0}{k \cdot B} - \mu_r \quad (5)$$

где k – удельный коэффициент экстинкции, м²/г СВ; α – коэффициент поглощения, μ_r – удельная скорость эндогенного расхода биомассы, сут⁻¹.

Для определения коэффициента поглощения света воспользуемся основополагающим законом оптики Бугера-Ламберта-Бера, записанного для культуры микроводорослей:

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot B}, \quad (6)$$

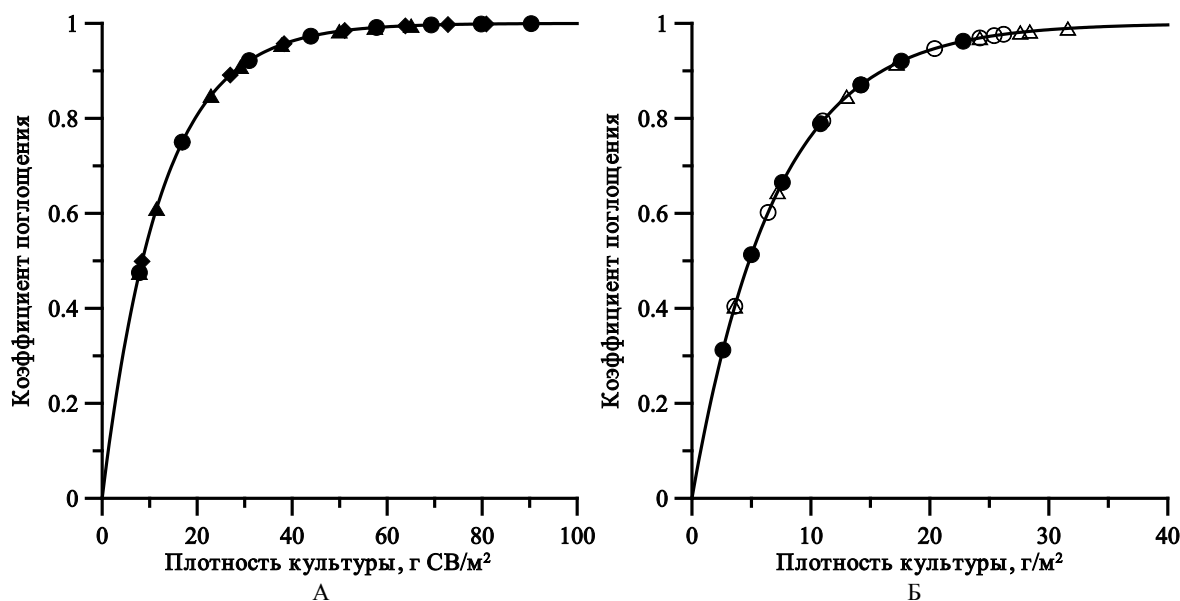


Рисунок 5. Зависимость коэффициента поглощения от биомассы *P. purpureum* (А) и *A. platensis* (Б)

где I , I_0 – интенсивность плоской монохроматической выходящей и падающей на слой вещества, k – удельный коэффициент экстинкции, зависящий от свойств растворенного вещества, B – поверхностная концентрация биомассы микроводорослей.

Коэффициент поглощения света суспензией имеет вид:

$$\alpha = 1 - e^{-k \cdot B} \quad (7)$$

Применимость уравнения (7) для описания процессов светопоглощения в оптически плотных культурах микроводорослей вызывает множество вопросов. Тем не менее, (7) с высокой точностью ($R^2 = 0,99$) позволяет описать полученные экспериментальные данные. На рисунке 5 представлена аппроксимация уравнением (7) зависимости коэффициента поглощения от биомассы для двух исследуемых видов. В результате расчёта определены коэффициент удельной экстинкции: 0,08 для *P. purpureum* и 0,14 для *A. platensis*. Это значит, что при 1 г при 1 м² клетки *P. purpureum* поглощают 8 % падающего света, а клетки *A. platensis* – 14 %, что обусловлено различным пигментным составом, эффективностью усвоения и преобразования световой энергии и пр.

Подставляя найденные значения экстинкции в (7), с учётом (5), получим окончательное уравнение зависимости удельной скорости роста от плотности культуры. Для примера, при 15 клк на линейном участке μ *P. purpureum* описывается уравнением (рис. 6):

$$\mu = \frac{1,48 \cdot (1 - e^{-0,08 \cdot B})}{0,08 \cdot B} - 0,1. \quad (8)$$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вне зависимости от вида микроводоросли и количества световой энергии, падающей на поверхность фотобиореактора, на линейном участке накопительной кривой наблюдается линейная взаимосвязь максимальной продуктивности с облучённостью. Полученные результаты справедливы для плоскопараллельных систем выращивания с тонким слоем культуры. В общем случае, линейный участок является результирующей относительно большого количества воздействующих факторов, которые приводят к постоянству скорости роста. Например, изменяющаяся эффективность усвоения световой энергии, изменение скорости синтеза тех или иных биохимических составляющих клеток и пр. Предложенная модель зависимости удельной скорости роста от биомассы с высокой точностью ($R^2 = 0,98$) позволяет описать гиперболическое снижение μ , однако не объясняет постоянства величины максимальной продуктивности. Дальнейшее развитие моделирования в данном направлении должно учитывать изменение биохимического состава клеток на линейном участке. Тем не менее, полученные результаты могут быть использованы при разработке теоретических основ линейного роста культур микроводорослей.

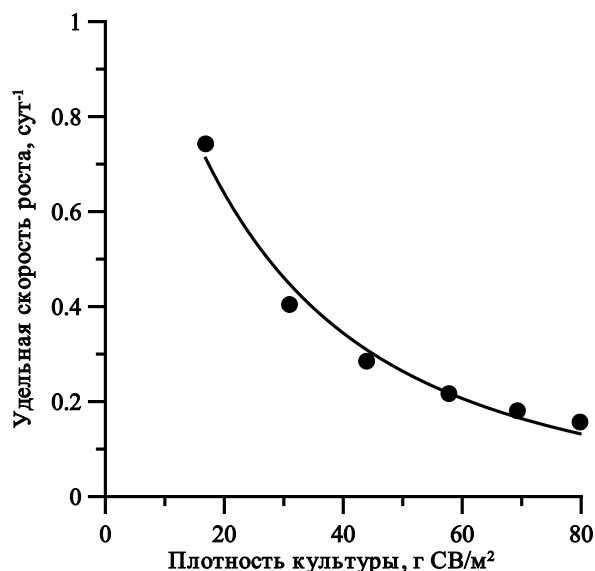


Рисунок 6. Зависимость удельной скорости роста от биомассы *P. purpureum* для линейной фазы накопительной культуры при 15 клк. Линия – расчёт по уравнению (8)

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», № гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6.

Список литературы / References:

1. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 1, с. 53-60. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Novikova T.M. Linear growth of marine microalgae in culture. *Marine biological journal*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 53-60. (In Russ.)]
2. Холл Д., Рао К. *Фотосинтез*. М.: Мир, 1983, 134 с. [Hall D., Rao K. *Photosynthesis*. M.: Mir, 1983, 134 p. (In Russ.)]
3. Алехина Н.Д. *Физиология растений: Учебник для студ. вузов* / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балконин, В.Ф. Гавриленко и др. Под ред. И. П. Ермакова. М.: «Академия», 2005, 640 с. [Alekhina N.D. *Plant Physiology: A Textbook for Stud. universities* / N.D. Alekhine, Yu.V. Balkonin, V.F. Gavrilenko et al. Ed. I.P. Ermakova. M.: "Academy", 2005, 640 p. (In Russ.)]
4. Liebig J. *Chemistry in its Application to Agriculture and Physiology*. London: Taylor and Walton, 1847, 418 p.
5. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей*. Белгород: ООО «КОНСТАНТА», 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling of microalgae growth*. Belgorod: CONSTANTA LLC, 2017, 152 p. (In Russ.)]
6. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 1981, т. 5, № 1, с. 75-82. [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. A series of biological sciences*, 1981, vol. 5, no. 1, pp. 75-82. (In Russ.)]
7. Zarrouk C. *Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D thèse. Paris, 1966, 114 p.
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 Unified installation for laboratory research of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1 (13). URL: <http://algology.ru/1097>. (In Russ.)]
9. Горбунова С.Ю., Боровков А.Б., Тренкеншу Р.П. Продуктивность культуры *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Geitler (Cyanoprokaryota) при различной обеспеченности минеральным фосфором. *Альгология*, 2011, т. 21, № 3, с. 374-384. [Gorbunova S.Yu., Borovkov A.B., Trenkenshu R.P. The productivity of the culture *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Geitler (Cyanoprokaryota) with different availability of mineral phosphorus. *Algology*, 2011, vol. 21, no. 3, pp. 374-384. (In Russ.)]
10. Гудвилевич И.Н., Боровков А.Б. Продукционные характеристики *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры. *Альгология*, 2014, т. 24, № 1, с. 34-46. [Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Production characteristics of *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross in the conditions of cumulative and quasi-continuous culture. *Algology*, 2014, vol. 24, no. 1, pp. 34-46. (In Russ.)]
11. Геворгиз Р.Г., Малахов А.С. *Пересчёт величины освещённости фотобиореактора в величину облучённости*. Севастополь: ООО «Колорит», 2018, 60 с. [Gevorgiz R.G., Malakhov A.S. *Recalculation of the illumination value of the photobioreactor into the irradiation value*. Sevastopol: Kolorit LLC, 2018, 60 p. (In Russ.)]

12. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. *Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей*. Новосибирск: Наука, 1980, 136 с. [Belyanin V.N., Sidko F.Ya., Trenkenshu A.P. *Energy of photosynthetic microalgae culture*. Novosibirsk: Science, 1980, 136 p. (In Russ.)]
13. Sánchez-Saavedra M.P., Castro-Ochoa F.Y., Nava-Ruiz V.M. et al. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum*. *J. Appl. Phycol.*, 2017. DOI: 10.1007/s10811-017-1284-2.
14. Satthong S., Saego K., Kitrunloadjanaporn P., Nuttavut N. Modeling the effects of light sources on the growth of algae. *Advances in Difference Equations*, 2019, DOI: 10.1186/s13662-019-2112-6.
15. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1949, vol. 3, pp. 371-394.

MAXIMUM PRODUCTIVITY OF *PORPHYRIDIMUM PURPUREUM* AND *ARTHROSPIRA PLATENSIS* BATCH CULTURE IN DIFFERENT LIGHT CONDITIONS

Lelekov A.S.¹, Klochkova V.S.², Gadzhi A.V.²

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

² Sevastopol State University
Universitetskaya 33, Sevastopol, 299053, Russia, e-mail: viki-iki@mail.ru

Abstract. The paper compares the growth rates of the red microalgae *Porphyridium purpureum* and cyanobacteria *Arthrospira platensis* at different values of surface irradiation for a linear phase of the batch curve. The illumination values measured in the klux are translated into irradiance values (energy PAR) taking into account the radiation spectrum of the fluorescent lamps. The values of maximum productivity on a linear phase of batch curves are determined. For *P. purpureum*, the highest value of this parameter was 0.62 g/(l·day) with a surface illumination of 15 klux, for *A. platensis* – 0.28 g/(l·day) at 8.3 klux. The dependence of maximum productivity on irradiation was studied, and the values of the tangent of the slope angle of the linear regression were calculated. The value of which was 0.1 for *P. purpureum* and 0.2 for *A. platensis*. It is shown that the dependence of the absorption coefficient on the culture density for both species is described with high accuracy ($R^2 = 0.99$) by the Booger-Lambert-Beer equation. The specific extinction coefficient was determined, which was 0.08 and 0.14 for *P. purpureum* and *A. platensis*, respectively. A model of the dependence of the specific growth rate of a microalgae culture on its biomass is proposed. Model was based on the assumption that the specific rate of synthesis is directly proportional to the amount of absorbed light energy. Verification of the model showed high compliance ($R^2 = 0.98$) with experimental data.

Key words: linear growth phase, maximum productivity, specific growth rate, irradiance, light absorption coefficient, specific extinction coefficient.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ДИФЕНИЛАЛАНИНОВЫХ ПЕПТИДНЫХ НАНОТРУБОК РАЗНОЙ ХИРАЛЬНОСТИ, СОДЕРЖАЩИХ МОЛЕКУЛЫ ВОДЫ

Быстров В.С., Филиппов С.В., Жулябина О.А., Твердислов В.А.

Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН

г. Пущино, РФ; e-mail: vsbys@mail.ru

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

г. Москва, РФ

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. В работе представлены и проанализированы результаты полуэмпирических расчетов (HyperChem) для дифенилаланиновых нанотрубок (PNT) разной хиральности (L-FF и D-FF), пустых и заполненных кластерами вода/лед, предварительно оптимизированных методами DFT (VASP). Полученные результаты показывают, что после оптимизации дипольный момент и поляризация как обоих типов L-FF и D-FF PNT, так и встроенных кластеров вода/лед усиливаются; кластеры вода/лед приобретают спиралевидную структуру, подобную L-FF и D-FF PNT. Обсуждаются сегнетоэлектрические свойства трубчатых спиральных кластеров вода/лед, полученных после оптимизации внутри PNT L-FF и D-FF, так же как и самих PNT L-FF и D-FF со встроенными кластерами вода/лед.

Ключевые слова: Дифенилаланин, пептидная нанотрубка, молекулы воды, молекулярное моделирование, полуэмпирические методы, самосборка, поляризация, хиральность.

Самосборка сложных молекулярных структур на основе аминокислот является одним из важнейших явлений как в живой природе, так и в искусственной биомиметике [1]. При этом существенную роль в процессах самосборки играет и хиральность исходных молекул [2, 3]. В настоящей работе мы сосредотачиваемся на дальнейшем исследовании структурных и физических (в т. ч. сегнетоэлектрических) свойствах пептидных нанотрубок на основе дифенилаланина (FF PNT) [4, 5] различной хиральности L-FF & D-FF, имеющих молекулярные кластеры воды во внутренней гидрофильной полости PNT [6]. Исследования пептидных нанотрубок дифенилаланина (FF PNT) показывают, что значительную роль в их самоорганизации и физических свойствах играют молекулы воды, расположенные во внутренней гидрофильной полости нанотрубок [6, 7]. Однако экспериментальные методы, такие как рентген, не дают четких структурных данных этих молекул воды [8]. Следовательно, компьютерное моделирование и традиционные расчеты молекулярной самосборки [4-7], а также новые визуально-динамические компьютерные методы [9] крайне необходимы для более четкой идентификации этих структур воды во внутренней полости нанотрубок и их изучения.

Недавно в работах [6, 10] нами были проведены расчеты методами теории функционала плотности (ТФП/DFT) с применением программного пакета Vienna ab initio simulation package (VASP) [11] и оптимизация структур PNT разной хиральности D-FF и L-FF, с сохранением постоянными параметров элементарной ячейки на основе экспериментально установленных кристаллографических данных [12-14], но с встроенными во их внутреннюю гидрофильную полость водно-ледяных кластеров на основе структур Ih гексагонального льда [7, 15]. Исследование таких структур с разным количеством молекул воды показало, что наиболее энергетически выгодным является количество молекул воды $n = 21$ на одну элементарную ячейку (или PNT из 2-х витков спирали). Это количество согласуется также с данными работ других авторов [16].

В данной работе, используя эти результаты DFT расчетов для оптимального количества $n = 21$ молекул воды в полости нанотрубок, мы исследуем структуры полученных оптимизированных водно-ледяных наноструктурированных кластеров во внутренней полости нанотрубок, их полярные свойства и влияние, оказываемое ими на общие свойства нанотрубок обоих типов хиральности. В том числе их влияние на изменение дипольных моментов и поляризации нанотрубок, а также влияние самих D-FF и L-FF PNT на изменение структуры и свойств (дипольных моментов и поляризации) встроенных водно-ледяных кластеров. На основе расчетов FF PNT методами теории функционала плотности в данной работе мы анализируем полярные свойства как самих PNT, так и их водных кластеров. Для этой цели здесь применяются квантовые полуэмпирические методы AM1, PM3, RM1 (из пакета HyperChem [17]). Для анализа структур используются также визуально-динамические методы [9, 18].

Рассмотрим теперь полярные свойства как нанотрубок с внедренными кластерами воды, так и самих кластеров воды. Для проведения расчетов полярных свойств данные, полученные в VASP, были преобразованы в рабочую среду HyperChem. Эта процедура была выполнена с использованием программ OpenBabel, Cuberduck и HyperChem [17] и оптимизированные структуры были преобразованы из периодических кристаллических структур D-FF и L-FF в VASP в рабочее пространство Hyper Chem в виде одной, двух и более витков спиралей D-FF и L-FF (как пустых, так и водными кластерами внутри), где были выполнены все дальнейшие вычисления. Кроме того, оптимизированные структуры кластеров воды были вырезаны из полости D-FF и L-FF для их самостоятельного исследования. Схема основных шагов этих процедур была подробно описана в [6, 10].

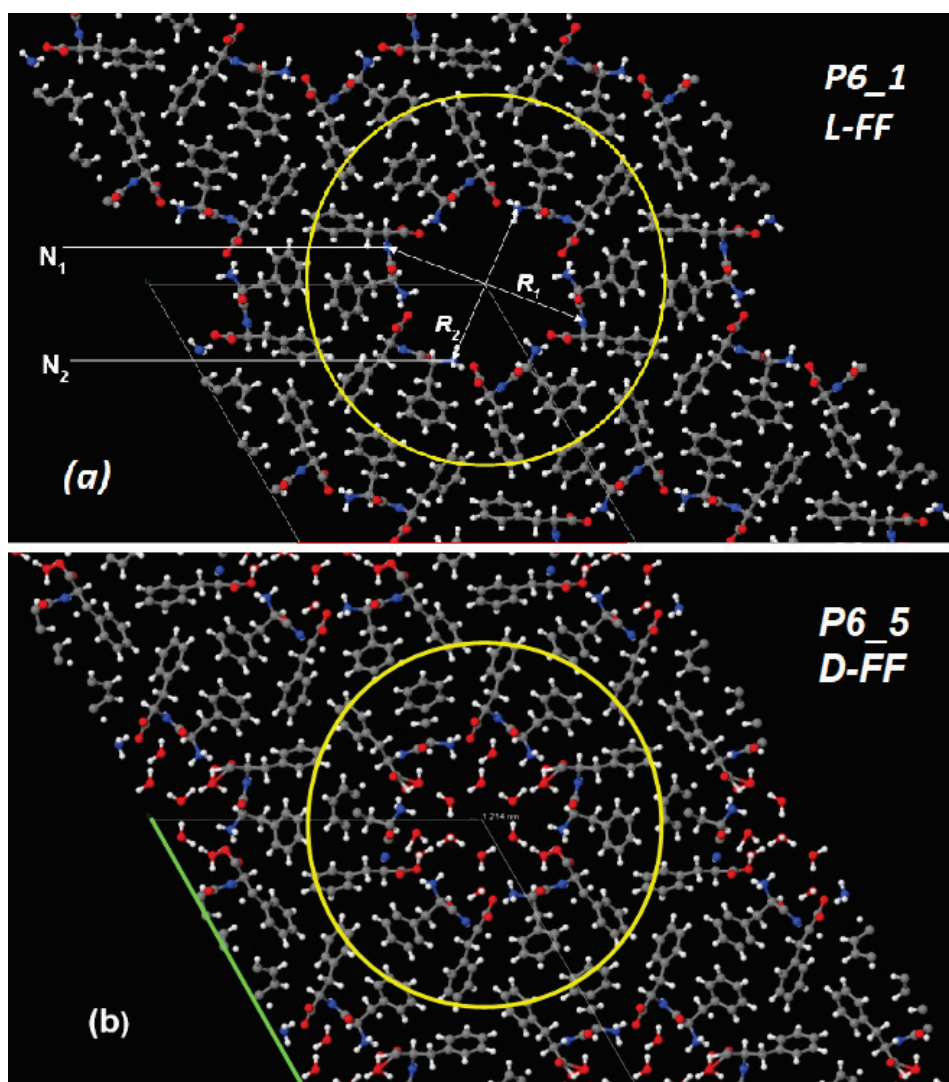


Рисунок 1. Изображения структур на основе данных Кембриджского кристаллографического центра данных (CCDC) [12-14] для двух различных энантиомеров FF с различными элементами симметрии (полученные с использованием Jmol после выполнения расчетов VASP) для случаев: (a) L-FF с пространственной группой $P6_1$ и не имеющей молекул воды во внутренней полости (как пример пустой безводной нанотрубки); (b) D-FF с пространственными группами $P6_5$ и содержащая исходный для оптимизации встроенный водно-ледяной кластер из 21 молекулы воды на основе структуры гексагонального льда [7, 15]. Гексагональные ячейки отмечены тонкими линиями на (a), и дополнительно выделены красной и зеленой линией на (b). Выбранные атомы и молекулы для образования нанотрубок PNT очерчены кружками желтых линий. Атомы отмечены цветами: кислород – красный, азот – синий, углерод – серый, водород – белый. На верхнем рисунке (a) показаны основные расстояния во внутренней полости нанотрубки: R_1 – между атомами азота $N_1...N_1$ (большой «дальний» диаметр нанотрубки PNT); R_2 – между атомами азота $N_2...N_2$ противоположных гидрофильных групп NH_3^+ (короткий или «ближний» внутренний диаметр PNT)

На рисунке 1 показаны модели, построенные в VASP (используя Jmol) для безводной структуры L-FF (рис. 1 a) и для D-FF, содержащей исходный водный кластер из 21 молекулы воды на основе структуры гексагонального льда **1h** (рис. 1 b). Результаты для моделей в HyperChem из 2-х витков спирали таких PNT представлены на рисунке 2.

Эти модели (показанные на Рис. 2), состоящие из 2-х витков спирали, соответствуют 2 слоям, извлеченным из структур, полученных в VASP с суперячейкой из их $4 = 2 \times 2$ начальных кристаллических элементарных ячеек в плоскости (см. Рис. 1; всего в суперячейке $8 = 2 \times 2 \times 2$ элементарных ячеек в 3-D объеме) для каждой структуры D-FF и L-FF. Они представляют простейшие периодические модели нанотрубок, содержащих по 42 H_2O молекулы (Рис. 2. с, f, g) на 2 витка спирали PNT. Основные параметры элементарных ячеек: а) L-FF: $a = b = 24,0709 \text{ \AA}$, $c = 5,456 \text{ \AA}$, б) D-FF: $a = b = 23,9468 \text{ \AA}$, $c = 5,4411 \text{ \AA}$; размеры внутренней полости: а) L-FF: $R_1 = 15,2712 \text{ \AA}$, $R_2 = 12,2183 \text{ \AA}$, б) D-FF: $R_1 = 15,1806 \text{ \AA}$, $R_2 = 12,1354 \text{ \AA}$. Отметим, что в работе [16] было установлено аналогичное расстояние $R_2 = 12,217 \text{ \AA}$ для L-FF, содержащих молекулы воды во внутренней полости нанотрубки, близкое к расстояниям, полученным в нашем случае $R_2 \sim 12,218 \text{ \AA}$ для L-FF. Это свидетельствует о том, что вода должна быть в полости и в экспериментальных случаях [12-14].

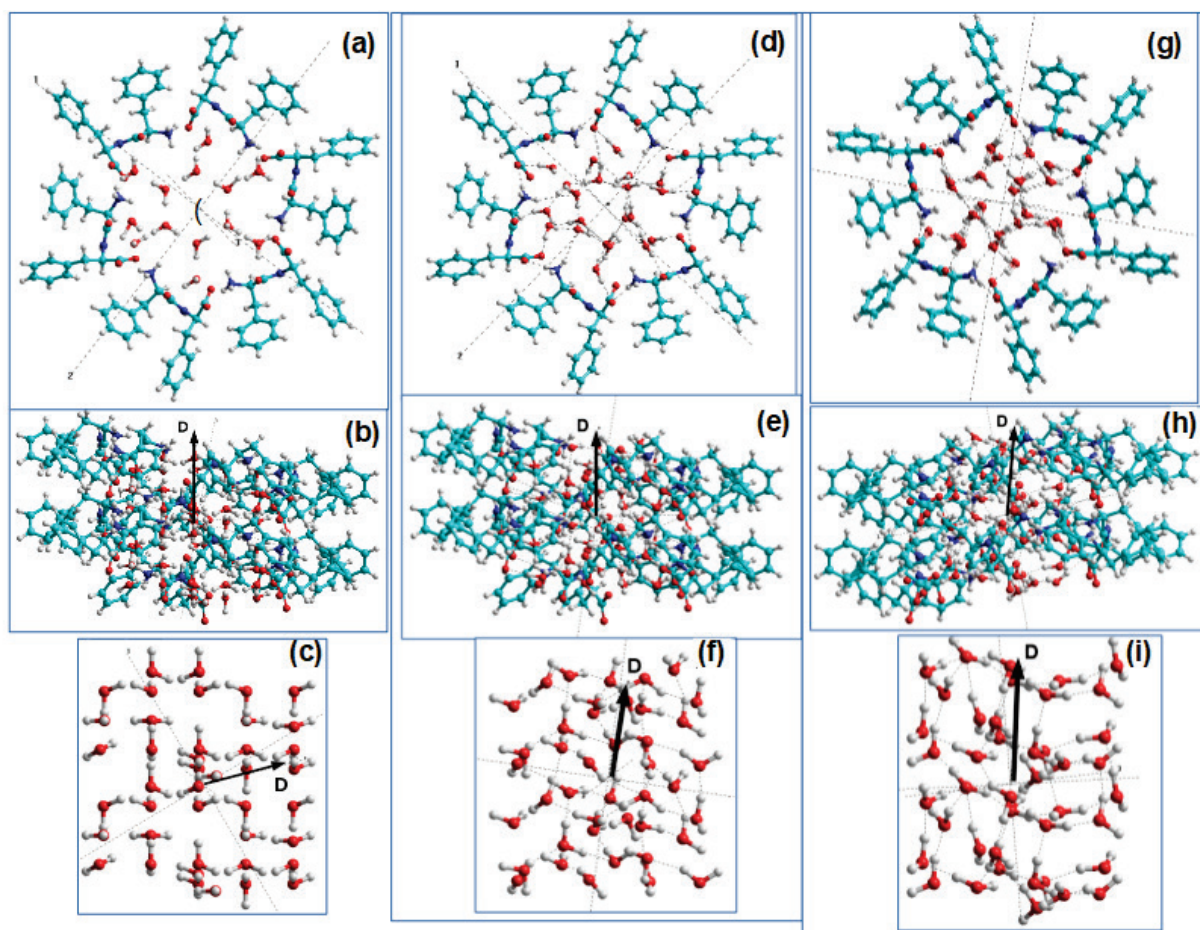


Рисунок 2. Схемы молекулярных моделей пептидных нанотрубок FF PNT, состоящих из 2-х витков их спиральной структуры, с внедренными кластерами из 21 молекулы воды: а) структура исходной нанотрубки D-FF PNT в Z-проекции, перпендикулярно сечению нанотрубки, с внедренным во внутреннюю гидрофильную полость кластером из 21 молекулы воды на основе модели структуры гексагонального льда *1h* [7, 15]; б) Y-проекция той же исходной структуры D-FF PNT; в) исходный кластер из 21 H₂O в Y-проекции, извлеченный из нанотрубки; д) структура D-FF PNT в Z-проекции с оптимизированным водным кластером; е) та же структура D-FF PNT с оптимизированным водным кластером в Y-проекции; ф) оптимизированный водный кластер, извлеченный из D-FF PNT, в Y-проекции; г) структура L-FF PNT в Z-проекции с оптимизированным водным кластером; х) та же L-FF PNT структура с оптимизированным водным кластером в Y-проекции; и) оптимизированный водный кластер, извлеченный из L-FF PNT в Y-проекции

Отметим, что в данном случае, мы оптимизируем только структуру кластера воды внутри полости PNT, сохраняя фиксированное («замороженное») положение всех остальных атомов для всех молекул FF и параметры элементарной ячейки кристаллических структур PNT. В этом случае происходит перегруппировка водородных связей как между молекулами воды в водном кластере, так и между молекулами воды и молекулами FF (в частности, с атомами азота и кислорода молекул FF) на внутренней гидрофильной поверхности полости нанотрубки. Это происходит как в D-FF PNT, так и в L-FF PNT, но по-разному, в соответствии с их различной внутренней структурой и хиральностью. В результате мы получаем две измененные и отличающиеся структуры кластеров воды после их оптимизации в случаях хиральности D-FF и L-FF (рис. 1, f и рис. 1, i).

Для каждой структуры (исходные безводные структуры D-FF и L-FF без молекул воды внутри, исходные и оптимизированные D-FF и L-FF с 21 молекулами воды на элементарную ячейку) были выполнены квантово-химические расчеты полуэмпирическими методами AM1, RM1 и PM3 в приближении Хартри-Фока (restricted Hartree-Fock - RHF). Полученные данные (энергии, дипольный импульс, поляризации), а также объемы всех молекулярных структур были представлены ниже в таблицах 1 и 2.

Проведенный анализ оптимизированных и исходных данных показал следующие основные результаты: 1) встроенные молекулярные кластеры воды после оптимизации имеют значительно больший собственный дипольный момент, причем сильно ориентированный вдоль основной оси с вдоль внутреннего канала PNT обоих типов хиральности D-FF и L-FF, тогда как раньше они не имели такой определенной ориентации и имели очень малый дипольный момент (рис. 2, табл. 1 и 2); 2) структурная организация обоих этих кластеров воды после оптимизации внутри полости PNT обоих типов D-FF и L-FF имеет очень большие изменения - оба приобрели свойства спирали с шагом спирали, таким какой имели сами PNT, каждая со своим направлением винта спирали

Таблица 1. Дипольные моменты и поляризация нанотрубок D-FF PNT и кластеров воды, рассчитанные с использованием метода AM1 RHF (HyperChem). (Близкие данные получены также методами PM3 и RM1)

Данные		D-FF - 2 Coils (два витка спирали)		Water/ice cluster 21 H ₂ O in D-FF cavity		D-FF + 21 H ₂ O после оптимизации
		Без воды H ₂ O	Исходный 21 H ₂ O	Исходный 21 H ₂ O	21 H ₂ O после оптимизации	
Дипольный момент, Дебай	Dt	140,385	139,520	1,104	29,404	158,461
	Dz	-140,349	-139,447	-0,876	-28,385	-158,441
Поляризация, Кл/м ²	VdW volume	Pt	0,1399274	0,005685	0,150753	0,13321788
		Pz	-0,1398915	-0,004511	-0,1455383	-0,13320106
	Solvent volume	Pt	0,0590361	0,001695	0,0510458	0,06148752
		Pz	-0,05902138	-0,001345	-0,049277	-0,0614798
Объем*) (VdW)	V, Å ³	3346,47	3894,86	647,80	650,55	3967,61
Объем **) (solvent for 1.4 Å)	V, Å ³	7931,75	8614,35	2172,99	1921,33	8596,16

*) Этот объем Ван-дер-Ваальса (VdW) рассчитывается путем расчета площади поверхности (сетки) VdW.

**) Этот объем рассчитывается путем расчета площади поверхности, доступной для растворителя, здесь указан эффективный радиус молекулы растворителя – значение 1,4 Å используется для воды.

D-FF и L-FF, соответственно (рис. 2-4); 3) суммарный дипольный момент и поляризация PNT как D-FF, так и L-FF, после их оптимизации вместе с содержащимися внутри их полости встроенными кластерами воды/льда из 21 молекулы H₂O, также увеличиваются в направлении главной оси с каждого типа PNT (табл. 1 и 2; рис. 3 и 4).

При этом компоненты как дипольных моментов, так и поляризации, имея сильную ориентацию Dz и Pz вдоль оси нанотрубок, несколько отличаются по компонентам в направлениях, перпендикулярных главной оси нанотрубок, и при этом – по-разному для случаев различной хиральности. То есть здесь имеются разные знаки и направление компонент Dy, Py в случаях L-FF PNT и D-FF PNT (как показано, например, также при ориентации полного дипольного момента D, на Рис. 3 и 4). Это как раз и соответствует образованию индуцированной (или модулированной) спиральной структуры для разных кластеров воды в нанотрубках разных типов хиральности. Как было показано ранее [21, 24, 25], при этом нанотрубки на основе молекул L-FF образуют правую спираль, а на основе D-FF образуют левую спираль. Таким образом, оптимизация водных кластеров внутри нанотрубок разной хиральности модулирует и разную структурную перестройку этих соответствующих водных кластеров. Этот последний результат (показанный на рис. 2 с, f, g), касающийся очень выраженной перестройки структуры кластера воды, подтверждается некоторыми другими важными расчетными данными. Так, изменения в энергии показывают, что основной сдвиг энергии связан с изменениями энергий взаимодействий ван дер

Таблица 2. Дипольные моменты и поляризация нанотрубок L-FF PNT и кластеров воды, рассчитанные с использованием метода AM1 RHF (HyperChem). (Близкие данные получены также методами PM3 и RM1)

Данные		D-FF - 2 Coils (два витка спирали)		Water/ice cluster 21 H ₂ O in D-FF cavity		D-FF + 21 H ₂ O после оптимизации
		Без воды H ₂ O	Исходный 21 H ₂ O	Исходный 21 H ₂ O	21 H ₂ O после оптимизации	
Дипольный момент, Дебай	Dt	140,757	133,110	1,104	28,646	157,8331
	Dz	-140,217	-130,279	-0,876	-28,386	-157,035
Поляризация, Кл/м ²	VdW volume	Pt	0,139501	0,005685	0,148244	0,13252224
		Pz	-0,138966	-0,004511	-0,146898	-0,13185222
	Solvent volume	Pt	0,0590361	0,001695	0,0494868	0,06073597
		Pz	-0,05902138	-0,0013447	-0,049038	-0,0604289
Объем*) (VdW)	V, Å ³	3365,60	3924,73	647,80	644,55	3972,63
Объем **) (solvent for 1.4 Å)	V, Å ³	7931,75	8673,83	2172,99	1930,83	8668,04

Ваальса (VdW) и водородных связей (НВ) структур молекул воды [6, 10]. Кроме того, изменения энергии возникают в результате образования новых водородных связей молекул воды с внутренней гидрофильной полостью D-FF и L-FF (а именно, с атомами N и O). Это подтверждается также и проведенным визуальным дифференциальным анализом структурных перестроек водных кластеров, на примере D-FF нанотрубок [18].

Интересно отметить, что исследования кластерных структур молекул воды, встроенных в углеродные нанотрубки и находящихся под воздействием высокого давления и температуры, приводят к образованию разнообразных спиральных структур [19], в чем-то аналогичных, полученным в этой нашей работе. Причем, в работе [19] была получена и двойная спираль воды в нано-льду, которая показывает структурное сходство с двойной спиралью ДНК. Отмечено также появление внутри углеродных нанотрубок и графеноподобного нано-льда, что, вероятно, индуцировано внутренней структурой углеродной нанотрубки, соответствующей при ее развертке в плоскость структуре графена. По-видимому, такое разнообразие структур фазы нано-льда внутри углеродных нанотрубок являются свидетельством адаптивности и универсальности каркаса водно-водородной связи к изменению внешней окружающей среды в таких микроскопических наноканалах, отмечают авторы [19].

Вода, ограниченная нанопорами, исследуется не только в углеродных нанотрубках, но и в других нанопористых структурах, например, в нанотрубках из нитрида бора (БННТ) с использованием расчетов из первых принципов [20]. Причем, отмечается, что в таких нано-структурированных тубулярных водных кластерах возможно формирование и структур, имеющих поляризацию и сегнетоэлектрические свойства. Так, исследование сегнетоэлектричества в ледяных (или водных) наноструктурах было недавно проведено в нанопористых силикатных материалах, которые имеют упорядоченную систему цилиндрических пор [21]. Предполагается, что в таких нитевидных порах исследуемых материалов возможно даже образуется сегнетоэлектрический лед XI.

Возвращаясь к первому важному результату, следует отметить, что извлеченные водно-ледяные кластеры имеют структуры, аналогичные спиральным нанотрубкам PNT D-FF и L-FF, с соответствующими каждой своими величинами шагам спирали c , которые отличны от данных исходной периодической структуры модели гексагонального льда (рис. 2 с). И они, соответственно, приобретают высокие дипольные моменты и значения поляризации, направленные вдоль оси c — по оси OZ нанотрубок по сравнению и исходными значениями. Так, дипольные моменты увеличиваются от ~ 1 Дебай до ~ 29 Дебай (табл. 1, 2). Дипольные моменты всей нанотрубки D-FF и L-FF с водой также увеличиваются: они возрастают с $\sim 139,5$ Дебай до $\sim 158,5$ Дебай для D-FF (табл. 1), и с $\sim 133,1$ Дебай до $\sim 157,8$ Дебай для L-FF (табл. 2). Из наших предыдущих исследований [4, 5] известно, что пустые безводные нанотрубки D-FF и L-FF обладают своими высоким собственными дипольными моментами (~ 138 -140 Дебай) и поляризацией, что определяется квантовыми расчетами AM1 и PM3 для этих структур без молекул воды. Аналогичные данные приведены в таблицах 1 и 2.

Хотя общая суммарная поляризация D-FF и L-FF с молекулами воды в полости также увеличивается, тут есть одна тонкость: значение поляризации также зависит и от объема структуры, имеющей дипольный момент (в единицах СИ поляризация равна $P = 3,33556255 \text{ D/V Кл/м}^2$). Но тут следует отметить, что в таких специфических молекулярных структурах как пептидные нанотрубки и водные кластеры, строго говоря их объем может быть определен различными подходами: 1) с использованием поверхности Ван-дер-Ваальса, (VdW), 2) с использованием расчетов по площади поверхности, доступной для растворителя (Volume solvent) [17, 22]. При этом, обычно для воды в качестве растворителя используется значение $\sim 1,4 \text{ \AA}$ (поскольку известно, что расстояния между молекулами H_2O в воде составляют $\sim 2,76 \text{ \AA}$) [17, 23]. В этой работе оба значения объема были использованы для расчета поляризации (табл. 1 и 2). В случае Volume solvent, например, для D-FF увеличение поляризации заметно (от начального значения для пустой нанотрубки $\sim 0,059 \text{ Кл/м}^2$, оно сначала уменьшилось, в случае внедренного кластера воды с исходной моделью гексагонального льда, до $\sim 0,054 \text{ Кл/м}^2$ и, затем, увеличилось до $\sim 0,062 \text{ Кл/м}^2$ после оптимизации), в то время как для случая VdW - это не так явно выражено (от начального значения $\sim 0,14 \text{ Кл/м}^2$, снизилось в случае начального кластер воды до $\sim 0,12 \text{ Кл/м}^2$, а затем увеличилось, но только до $\sim 0,133 \text{ Кл/м}^2$) (табл. 1). Аналогично и для L-FF (табл. 2). Следовательно, задействованный объем V очень важен для правильной оценки значения поляризации.

Далее, важно отметить, что сами исходно пустые безводные PNT обоих типов хиральности D-FF и L-FF имели высокие дипольные моменты и поляризацию, направленные в основном вдоль оси нанотрубок [4-7, 13].

В любом случае, поляризация, полученная для пустой безводной PNT D-FF, имеет значения $P \sim 0,06$ -14 Кл/м² (табл. 2) и соответствующее электрическое поле $E = P/(\epsilon\epsilon_0) \sim 1,7$ -4.0 ГВ/м (для $\epsilon = 4$ [13] и ϵ_0 — диэлектрическая постоянная вакуума). Такое сильное электрическое поле, направленное вдоль основной оси c нанотрубки внутри полости, вызывает ориентацию каждого диполя молекул воды вдоль этого направления.

В результате, водная нанотрубка приобретает такие свои полярные свойства под воздействием структур L-FF и D-FF — это самосогласованный и самоорганизующийся процесс, модулируемый и индуцируемый электрическим полем от сильно ориентированного дипольного момента D-FF и L-FF и их спиральных структур.

В связи с этим следует упомянуть работу [24], в которой молекулы воды в углеродной нанотрубке изучались в приложенном электрическом поле. При приложении электрического поля $1 \text{ В/нм} = 1 \text{ ГВ/м}$ вода образует твердоподобную структуру для всех температур моделирования до 350 К. Авторы [24] считают, что электрическое поле индуцирует фазовый переход из жидкости в ледяную нанотрубку при температурах до 350 К и электростатическое взаимодействие внутри ледяной нанотрубки в электрическом поле заметно сильнее, чем в отсутствие электрического поля. Кроме того, некоторые исследовательские группы активно проводят прямое исследование сегнетоэлектрических явлений в трубчатых и одномерных упорядоченных наноструктурах воды и

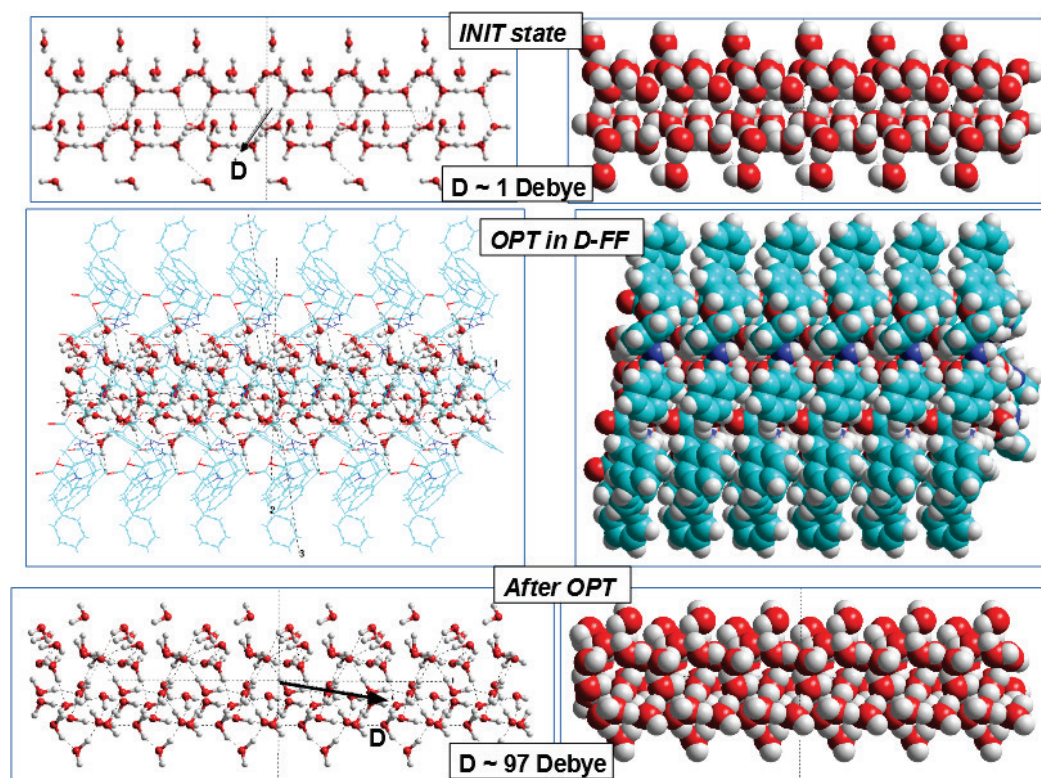


Рисунок 3. Изображения водно-ледяных трубчатых наноструктур и D-FF PNT с водой внутри полости из 6 повторяющихся витков вдоль оси c (в X-проекции): а) исходная начальная трубчатая структура вода/лед, б) D-FF PNT со встроенными структурами вода/лед в процессе оптимизации, в) трубчатая спираль вода/лед структура после оптимизации внутри D-FF PNT, д), е) и ф) то же самое в представлении по поверхностям VdW. Вектор D показывает направление полного дипольного момента в исходном и оптимизированном кластере

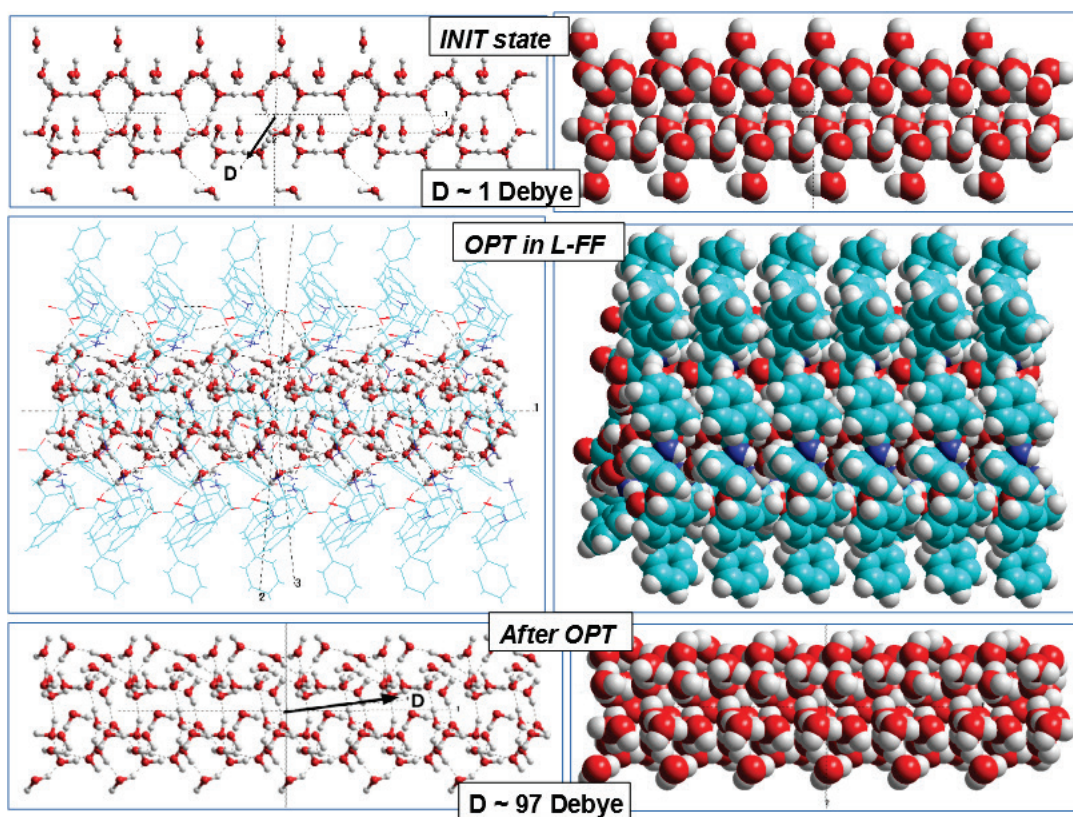


Рисунок 4. Изображения водно-ледяных трубчатых наноструктур и L-FF PNT с водой внутри полости из 6 повторяющихся витков вдоль оси c (в X-проекции): а) исходная начальная трубчатая структура вода/лед, б) L-FF PNT со встроенными структурами вода/лед в процессе оптимизации, в) трубчатая спираль вода/лед структура после оптимизации внутри L-FF PNT, д), е) и ф) то же самое в представлении по поверхностям VdW. Вектор D показывает направление полного дипольного момента в исходном и оптимизированном кластере

льда. Так, в [25] сегнетоэлектрические свойства льда внутри одностенных углеродных нанотрубок были исследованы методом молекулярной динамики. Авторы назвали их «ледяными нанотрубками» (ледяные НТ) и обнаружили, что они состоят из многоугольных водяных колец, сложенных в одном направлении вдоль оси нанотрубок. В [25] было обнаружено, что такие ледяные НТ демонстрируют ступенчатую поляризацию со значительной петлей гистерезиса в зависимости от напряженности внешнего поля, что характерно для сегнетоэлектриков. Также, в [25] было обнаружено, что сформированные модельные структуры пятиугольных и семиугольных ледяных НТ являются, вероятно, самыми маленькими в мире сегнетоэлектриками со спонтанной поляризацией около $1 \text{ мКл/см}^2 \sim 0.01 \text{ Кл/м}^2$. Это значение того же порядка, что и в нашем случае, но они даже немного меньше – например, у нас поляризация достигает значений $\sim 0,062\text{--}0,133 \text{ Кл/м}^2$ для D-FF PNT со встроенным оптимизированным кластером вода/лед, и даже еще больше до значений $\sim 0,05\text{--}0,15 \text{ Кл/м}^2$ в случае одной такой «извлеченной» из PNT ледяной нанотрубки (табл. 1 и аналогично для L-FF в табл. 2).

Заключение.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в среднем после оптимизации кластера вода/лед, заключенного во внутренней гидрофильной полости нанотрубок, они приобретают сильно анизотропные электрические свойства со значительными величинами, дипольные моменты которых ориентированы в основном вдоль оси нанотрубок.

Такое очевидное и радикальное изменение, модулируемое влиянием свойств и структурных особенностей D-FF, было впервые установлено здесь с использованием прямого моделирования и расчетов с использованием DFT (VASP) [6, 10, 11] и различных полуэмпирических квантовых методов AM1, PM3, RM1 (HyperChem) [4, 5, 17]. Рисунки 3 и 4 наглядно показывают примеры этого эффекта в D-FF и L-FF PNTs – изменения и увеличения дипольных моментов и изменения структур. Это новое открытие может привести в будущем к разработке и появлению совершенно неожиданных приложений, а также может послужить дальнейшему развитию, возможно, еще не совсем ясных нанотехнологических, медицинских и биологических прорывов.

В заключение, важно также отметить, что все эти результаты показывают потенциальные применения нанотрубок, в том числе и исследованных пептидных нанотрубок D-FF и L-FF PNTы, инкапсулирующих различные диэлектрические материалы, в том числе и тубулярные водно-ледяные кластеры, для изготовления самых маленьких сегнетоэлектрических устройств. В свою очередь, мы предполагаем, что такие и подобные полярные системы на основе трубчатых ледяных наноструктур, образованных внутри пептидных нанотрубок, имеют большое будущее для множества применений во многих наноустройствах. Как известно, сегнетоэлектрические свойства, помимо поляризации, также представляют такое свойство, как пьезоэлектричество, которое, как известно, имеет сейчас многочисленные практические применения.

Теоретическая часть исследования была выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации №0017-2019-0009 (Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН) и № 01201373458. Апробация и реализация подхода были поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований, проекты 18-07-00354-а (С.В. Филиппов) и № 19-01-00519-а (В.С. Быстров).

Список литературы / References:

1. Calvin M. *Chemical evolution. Molecular evolution, towards the origin of living system on the Earth and elsewhere*. Oxford: Claredon, 1969.
2. Tverdislov V.A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 128-132. DOI: 10.1134/S0006350913010156.
3. Malysheko E.V., Tverdislov V.A. Physical Principles of Discrete Hierarchies Formation in Protein Macromolecules. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*, 2017, vol. 917, 042025. DOI: 10.1088/1742-6596/917/4/042025.
4. Bystrov V.S., Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S., Kopyl S., Zhulyabina O.A., Tverdislov V.A. Molecular modeling and computational study of the chiral-dependent structures and properties of the self-assembling diphenylalanine peptide nanotubes. *J. Mol. Modeling*, 2019, vol. 25, p. 199. DOI: 10.1007/s00894-019-4080-x.
5. Bystrov V.S., Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S., Kopyl S., Zhulyabina O.A., Tverdislov V.A. Chiral peculiar properties of self-organization of diphenylalanine peptide nanotubes: modeling of structure and properties. *Mathematical Biology and Bioinformatic*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. 94-124. DOI: 10.17537/2019.14.
6. Bystrov V.S., Coutinho J., Zhulyabina O.A., Kopyl S.A., Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S., Tverdislov V.A., Filippov S.V., Kholkin A.L., Shur V.Ya. Modeling and physical properties of diphenylalanine peptide nanotubes, containing the water molecules. *Ferroelectrics*, 2020. – In print.
7. Bystrov V.S., Kopyl S.A., Zelenovskiy P., Zhulyabina O.A., Tverdislov V.A., Salehli F., Ghermani N.E., Shur V.Ya, Kholkin A.L. Investigation of physical properties of diphenylalanine peptide nanotubes having different chiralities and embedded water molecules. *Ferroelectrics*, 2018, vol. 525, pp. 168-177. DOI: 10.1080/00150193.2018.14328.
8. Ryan H, Carter M., Stenmark P., Stewart J.J., Braun-Sand S.B. A comparison of X-ray and calculated structures of the enzyme MTH1. *J. Mol. Mod.*, 2016, vol. 22, no. 7, pp. 1-18.
9. Филиппов С.В., Быстров В.С. Визуально-дифференциальный анализ структурных особенностей внутренних полостей двух хиральных форм дифенилаланиновых нанотрубок. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 3, с. 445-452, DOI: 10.31857/S0006302920030035. [Filippov S.V., Bystrov V.S. A Visual Differential Analysis of

- Structural Features of Internal Cavities in Two Chiral Forms of Diphenylalanine Nanotubes. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 374-380. (In Russ.)]
10. Bystrov V.S., Coutinho J., Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S., Kopyl S., Filippov S.V., Zhulyabina O.A., Tverdislov V.A. Molecular modeling and computational study of the chiral-dependent structures and properties of the self-assembling diphenylalanine peptide nanotubes, containing water molecules. *J. Mol. Mod.*, 2020. – In print.
 11. Vienna ab initio simulation package (VASP). URL: <https://www.vasp.at>.
 12. The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). UKR: <https://www.ccdc.cam.ac.uk>. [Crystallographic data for D-FF structure [13] have been deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre, no. CCDC 1853771; Crystallographic data for L-FF [14] is correspond to No. CCDC 16337].
 13. Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S., Kopyl S., Arkhipov S.G., Vasilev S.G., Bystrov V.S., Gruzdev D.A., Waliszek M., Svitlyk V., Shur V.Ya., Marfa L., Kholkin A.L. Chirality-Dependent Growth of Self-Assembled Diphenylalanine Microtubes. *Crystal Growth & Design*, 2019, vol. 19, pp. 6414-6421, DOI: 10.1021/acs.cgd.9b00884.
 14. G'orbitz C.H. Nanotube formation by hydrophobic dipeptides. *Chem Eur J.*, 2001, vol. 7, pp. 5153-5159.
 15. Morrison I., Li J.-C., Jenkins S., Xantheas S.S., Payne M.C., Ab-Initio Total Energy Studies of the Static and Dynamical Properties of Ice Ih. *J. Phys. Chem. B*, 1997, vol. 101, pp. 6146-6150.
 16. Andrade-Filho T., Martins T.C., Ferreira F.F., Alves W.A., Rocha A.R. Water-driven stabilization of diphenylalanine nanotube structures. *Theor. Chem. Acc.*, 2016, vol. 135, p. 185.
 17. HyperChem: Tools for Molecular modeling (release 8) (Hypercube, Inc., Gainesville, 2002). URL: <http://www.hyper.com/?tabid=360>.
 18. Филиппов С.В., Лихачёв И.В., Быстров В.С. Визуально-дифференциальный анализ структурных перестроек водных кластерных структур, находящихся во внутренней полости нанотрубок. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 3. – В печати. [Filippov S.V., Lihachyov I.V., Bystrov V.S. Vizual'no-differencial'nyj analiz strukturnyh perestroek vodnyh klasternyh struktur, nahodyashchih'sya vo vnutrennej polosti nanotrubok. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 3. – In print. (In Russ.)]
 19. Bai J., Wang J., X. C. Zeng X.C. Multiwalled ice helices and ice nanotubes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 52, pp. 19664-19667.
 20. Shayeganfar F., Beheshtian J., Shahsavari R. First-Principles Study of Water Nanotubes Captured Inside Carbon/Boron Nitride Nanotubes. *Langmuir*, 2018, vol. 34, no. 37, pp. 11176-11187.
 21. Бордонский Г.С., Орлов А.О. Исследование сегнетоэлектрических фазовых переходов воды в нанопористых силикатах при совместных электрических шумовых и калориметрических измерениях. *Физика твердого тела*, 2014, т. 56, № 8, с. 1575-1582.
 22. Bodor N., Gabanyi Z., Wong A. A new method for the estimation of partition coefficient. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, p. 3783.
 23. Gavezotti A. The calculation of molecular volumes and the use of volume analysis in the investigation of structured media and solid-state organic reactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, vol. 105, p. 5220.
 24. Winarto W., Yamamoto E., Yasuoka K. Water Molecules in a Carbon Nanotube under an Applied Electric Field at Various Temperatures and Pressures. *Water*, 2017, vol. 9, no. 7, p. 473.
 25. Mikami F., Matsuda K., Kataura H., Maniwa Y. Dielectric Properties of Water inside Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, no. 5, pp. 1279-1287.

MOLECULAR MODELING OF THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF DIPHENYLALANINE PEPTIDE NANOTUBES OF DIFFERENT CHIRALITY CONTAINING WATER MOLECULES

Bystrov V.S., Filippov S.V., Zhulyabina O.A., Tverdislov V.A.

Institute of Mathematical Problems of Biology RAS – Branch Keldysh Institute of Applied Mathematics RAS

Pushchino, Russia; e-mail: vsbys@mail.ru

M.V. Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russia

Abstract. The paper presents and analyzes the results of semi-empirical calculations (HyperChem) for diphenylalanine nanotubes (PNT) of different chiralities (L-FF and D-FF), empty and filled with water/ice clusters, previously optimized by DFT (VASP) methods. The results obtained show that, after optimization, the dipole moment and polarization of both L-FF and D-FF PNT types and embedded water/ice clusters are enhanced; water/ice clusters acquire a helix-like structure similar to L-FF and D-FF PNT. Ferroelectric properties of tubular helix-like water/ice clusters obtained after optimization within PNT L-FF and D-FF, as well as PNT L-FF and D-FF *per se* with embedded water/ice clusters are discussed.

Key words: diphenylalanine, peptide nanotube, water molecules, molecular modeling, semi-empirical methods, self-assembly, polarization, chirality.

ЭЛЕКТРОННЫЕ СОСТОЯНИЯ АКРИДИНОВОГО ОРАНЖЕВОГО В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Костюкова Л.О.¹, Леонтьева С.В.¹, Воронин Д.П.², Рыбакова К.А.²,
Бучельников А.С.², Костюков В.В.²

¹ Черноморское высшее военно-морское училище им. П.С. Нахимова
ул. Дыбенко, 1а, г. Севастополь, 299028, РФ

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viktor_kostukov@mail.ru
Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. При помощи нестационарной теории функционала плотности изучены электронные состояния молекулы флуоресцентного красителя акридинового оранжевого в катионной (протонированной) и нейтральной формах в водном растворе. Исследованы переходы между этими состояниями, соответствующие поглощению молекул красителя в видимой области спектра. Вычислены и проанализированы с точки зрения теории сольватохромизма дипольные моменты основного и возбужденных состояний.

Ключевые слова: акридиновый оранжевый, нестационарная теория функционала плотности, модель поляризуемой сплошной среды, электронные переходы, молекулярные орбитали, сольватохромизм.

ВВЕДЕНИЕ

Акридиновый оранжевый (3,6-диметиламиноакридин, АО – рис. 1) – флуоресцентный краситель, который широко используется на практике в течение многих лет.

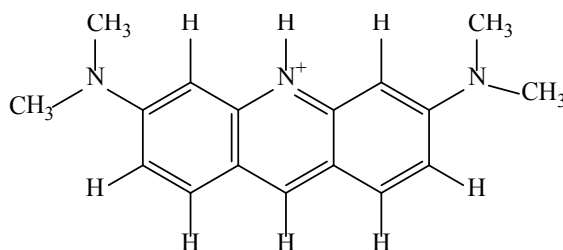


Рисунок 1. Структурная формула катиона АО

Основными направлениями его применения являются окрашивание тканей и клеток, зондирование различных систем и фотодинамическая терапия. В частности, АО используется как оптический зонд для исследования свойств мембран и мицелл поверхностно-активных веществ. Фотодинамическое действие АО на клетки обусловлено его связыванием с ДНК и индуцированным им переходом кислорода в синглетное состояние.

Связывание АО с нуклеиновыми кислотами интенсивно исследуется экспериментально на протяжении многих лет, в основном, оптическими методами. Молекула АО может образовывать комплекс с одно- и двухнитевыми молекулами нуклеиновых кислот в основном посредством интеркаляции. При интеркаляции в двойную спираль ДНК максимум испускания АО в водном растворе смещается от 514 нм до 530 нм, а при связывании с одонитевой РНК – до 640 нм [1]. При этом АО может использоваться как флуоресцентный зонд для изучения комплексообразования с ДНК других соединений.

Кроме нуклеиновых кислот, АО способен эффективно связываться с аминокислотами и белками, органическими крупными и малыми молекулами, что также в основном исследовалось при помощи оптических экспериментов. В случае последних наибольший интерес представляет фотоиндуцированные переносы заряда и энергии в гетерокомплексах и обусловленное им изменение флуоресценции.

Агрегация АО исследована достаточно подробно – как в растворах, так и в кристалле, на поверхности глины, белкового комплекса, мицелл поверхностно-активных веществ. Разбавленный водный раствор АО (мономерная форма) имеет максимум поглощения $\lambda_{\text{max}}=492$ нм, при увеличении концентрации максимум поглощения смещается до $\lambda_{\text{max}}=465$ нм (димер), изобестической точке соответствует 472 нм. При концентрациях выше $(4\ldots 5)\times 10^{-5}$ М максимум соответствует $\lambda_{\text{max}}=450$ нм (агрегаты вышних порядков), а изобестическая точка исчезает. Агрегация АО в водном растворе очень сильна (константа димеризации по данным разных авторов $K_d \approx 15000$ М), и поэтому растворы АО не подчиняются закону Бэра [2].

При $\text{pH} < 10$ молекула АО протонируется и находится в растворе в кислотной форме (катион) с $\lambda_{\text{max}}=492$ нм (рис. 1). В сильнощелочной среде ($\text{pH} > 10$) АО существует в виде нейтрального основания с $\lambda_{\text{max}}=435$ нм [3]. Для получения раствора основания АО в протонном растворителе необходимо добавление щелочи; апротонный растворитель должен быть тщательно очищен от протонных примесей: даже следов последних достаточно для протонирования нейтральных молекул АО. Нейтральная форма АО не агрегирует в воде и органических

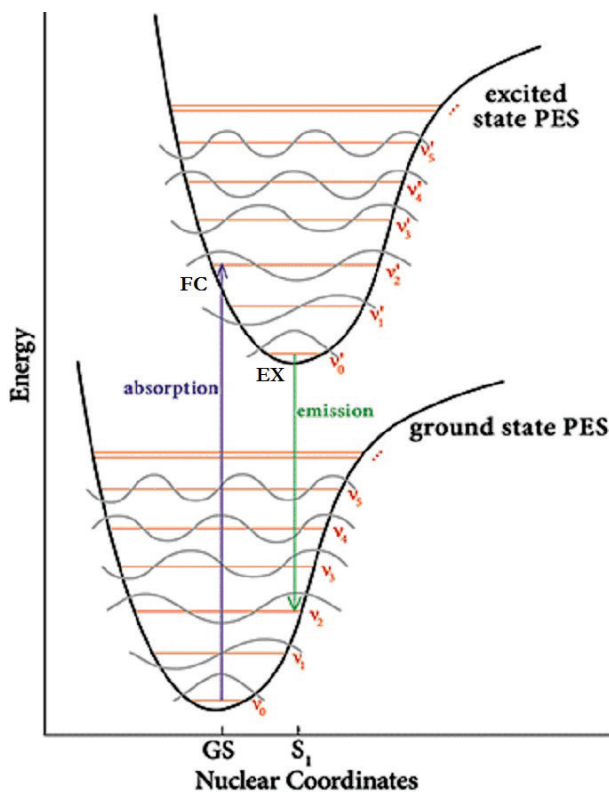
растворителях [2,3], поэтому ее растворы подчиняются закону Бэра. Следовательно, в интенсивной агрегации катионов АО важную роль играет взаимодействие их дипольных моментов.

Выполнено значительное число исследований оптических свойств АО. Данный краситель проявляет метахромизм, т.е. максимумы поглощения и испускания АО существенно зависят от его ближайшего молекулярного окружения, т.е. от связанных с ним молекул. На этом явлении основано практическое использование АО как оптического зонда (см. выше). В то же время сольватохромизм АО (как кислотной AOH^+ , так и основной AO^0 форм) весьма слаб. При увеличении полярности растворителя максимумы поглощения и испускания и незначительно смещаются в длинноволновую область (батохромный сдвиг). Это свидетельствует о большей стабилизации растворителем возбужденного состояния молекулы по сравнению с основным. Следовательно, дипольный момент АО в возбужденном состоянии должен быть больше, чем в основном [4].

Несмотря на долгую историю экспериментальных исследований оптических свойств АО, до сих пор не дано их последовательное теоретическое объяснение. Экспериментальное и теоретическое изучение основного и возбужденного состояний AOH^+ было выполнено в [5]. В [6] вычислены ИК спектры поглощения AOH^+ . В [7] методами квантовой химии в приближении PPP (Pariser-Pople-Parr) было установлено, что для AOH^+ поглощение в УФ части спектра приводит к поляризации молекулы поперек хромофора, а в видимой - вдоль хромофора. Однако этот результат противоречит выводам [8,9]. Оптические спектры АО до сих пор не вычислены теоретически. В настоящей работе при помощи нестационарной теории функционала плотности (Time-Dependence Density Functional Theory, TD-DFT) согласно методике [10] нами выполнен расчет фотоиндуцированных электронных переходов в молекулах AOH^+ и AO^0 в водном растворе.

МЕТОДЫ

Исходная пространственная структура молекулы АО была взята из базы данных <http://www.chemspider.com> (ChemSpider ID 56136). Добавление атомов водорода и их предварительная оптимизация выполнялись при помощи программы HyperChem8.0. Все основные вычисления выполнялись при помощи программного пакета Gaussian16. Визуализация пространственных структур и поверхностей выполнена при помощи пакета GaussView. Водное окружение задавалось неявно при помощи модели поляризуемой сплошной среды (Polarizable Continuum Model-PCM), адаптированной для TD-DFT [11,12]. Ее особенностью является совместное использование равновесной и неравновесной сольватации. При поглощении фотона молекулой растворенного вещества, находящегося в основном состоянии S_0 (координаты ядер GS на рис. 2) согласно принципу Франка-Кондона в ней происходит перераспределение электронной плотности при неизменных положениях ядер, т.е. молекула растворенного вещества переходит в возбужденное неравновесное (Франк-Кондон, FC) состояние (вертикальный переход «поглощение» на рис. 2). При этом аналогичный процесс (поляризация при неподвижных ядрах) происходит в ближайшей сольватной оболочке (неравновесная сольватация).



После этого система «растворенное вещество-растворитель» релаксирует к равновесному возбужденному состоянию (EX) с координатами ядер S_1 (рис. 2) путем смещения ядер и соответствующего этому перераспределения электронной плотности (равновесная сольватация). Из состояния S_1 при флуоресценции молекула может испустить фотон (вертикальный переход «поглощение» на рис. 2). В настоящей работе квантовохимический расчет AOH^+ и AO^0 выполнялся на уровне теории X3LYP/6-31G(d,p), который показал наилучшее совпадение расчетных максимумов поглощения с экспериментальными для водных растворов обеих форм красителя. Функционал X3LYP [13] представляет собой существенно усовершенствованную версию популярнейшего, но устаревшего функционала B3LYP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На уровне теории X3LYP/6-31G(d,p) катион AOH^+ имеет 400 молекулярных орбиталей (МО), из которых 71 занята, а 329 свободны. Таким образом, МО №71 является наивысшей занятой (HOMO), а МО №72 – наинизшей незанятой (LUMO). Нейтральная форма AO^0 содержит 395 МО, из которых также 71 занята, а 324 свободны. Как упоминалось выше, водный раствор катиона AOH^+ имеет максимум поглощения в видимой области $\lambda_{\text{max}}=492$ нм ($\pi \rightarrow \pi^*$ переход). Согласно нашим расчетам, он обусловлен, главным образом, синглетным переходом $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$. При этом максимум поглощения водного раствора нейтральной формы AY^0 $\lambda_{\text{max}}=435$ нм определяется переходом $\text{HOMO} \rightarrow (\text{LUMO}+1)$ (табл. 1).

Таблица 1. Расчетные фотоиндуцированные переходы в протонированной и нейтральной формах красителя

АОН ⁺				
Переход	Задействованные орбитали	Вклад, %	Сила осциллятора <i>f</i>	Энергия перехода (эВ/нм)
S ₀ →S ₁	HOMO→LUMO	98	0,8823	2,84/437
	(HOMO-1)→(LUMO+1)	2		
S ₀ →S ₂	(HOMO-1)→LUMO	98	0,0002	3,05/407
S ₀ →S ₃	(HOMO-2)→LUMO	73	0,0185	4,06/305
	(HOMO-1)→(LUMO+1)	24		
АО ⁰				
S ₀ →S ₁	HOMO→LUMO	99	0,0085	2,93/424
S ₀ →S ₂	HOMO→(LUMO+1)	5	0,5132	3,09/402
	(HOMO-1)→LUMO	94		
S ₀ →S ₃	(HOMO-3)→LUMO	99	0.0009	4.04/307

Распределение электростатического потенциала в основном и возбужденных состояниях вблизи поверхности АО показано на рисунке 2 (оттенки красного соответствуют положительным значениям потенциала, синего – отрицательным).

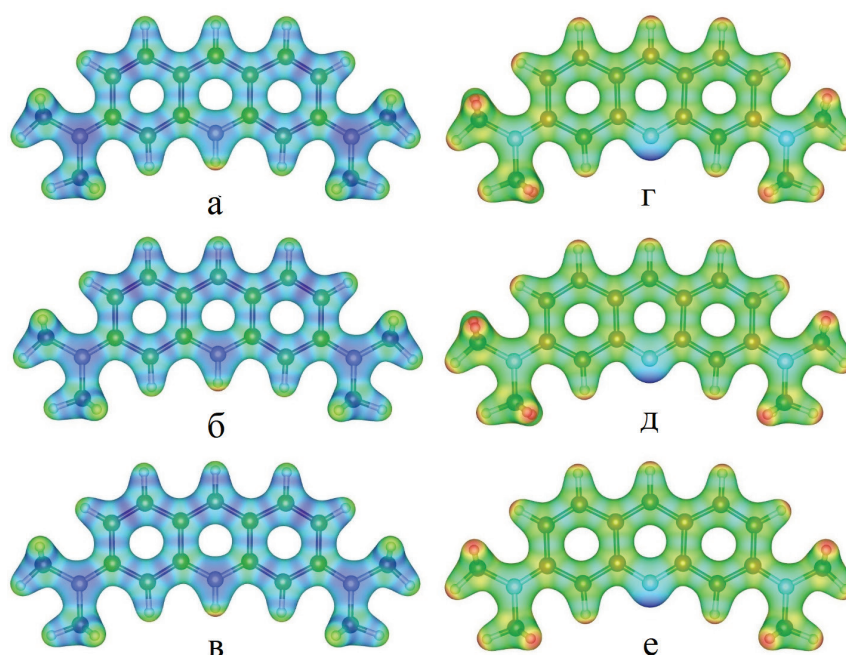
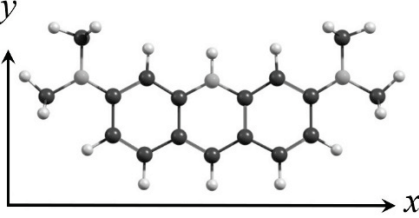


Рисунок 3. Визуализация электростатического потенциала молекул AOH^+ и AO^0 соответственно в основном (а,г), франк-кондоновском (б,д) и равновесном возбужденном (в,е) состояниях

Как видно из рисунка 3, данное распределение существенно различно для протонированной и непротонированной форм красителя. В то же время, между собой основное и возбужденные состояния для данной формы молекулы отличаются незначительно. Это свидетельствует о незначительном внутримолекулярном переносе заряда при фотовозбуждении как AOH^+ , так и AO^0 .

Результаты расчета дипольных моментов AOH^+ и AO^0 (табл. 2) согласуются с экспериментальными результатами и теоретическими результатами других авторов [5] и качественно соответствуют стандартной теории сольватохромизма (см. ВВЕДЕНИЕ): $\mu_{\text{gs}} < \mu_{\text{ex}}$.

Таблица 2. Расчетные дипольные моменты (Д) катионной и нейтральной форм красителя

 Координатные оси направлены вдоль главных осей инерции молекул			
Дипольный момент	Основное состояние	Франк-кондоновское состояние	Равновесное возбужденное состояние
AOH^+			
μ_x	0,004	0,002	0,002
μ_y	-2,48	-4,87	-4,86
μ_z	0,0005	0,0004	0,0001
μ	2,48	4,87	4,86
AO^0			
μ_x	-0,01	0,01	-0,008
μ_y	0,75	-1,81	-2,00
μ_z	0,0008	0,0006	0,0000
μ	0,75	1,81	2,00

ВЫВОДЫ

1. Поглощение света протонированной формой AOH^+ соответствует электронному переходу $S_0 \rightarrow S_1$, $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$, а нейтральной $\text{AO}^0 - S_0 \rightarrow S_2$, в основном $(\text{HOMO}-1) \rightarrow \text{LUMO}$ и, в значительно меньшей степени, $\text{HOMO} \rightarrow (\text{LUMO}+1)$.
2. Распределение электронной плотности и электростатического потенциала существенно различаются для AOH^+ и AO^0 .
3. Фотоиндуцированный перенос заряда незначителен как для AOH^+ , так и для AO^0 .
4. Расчетные дипольные моменты для AOH^+ и AO^0 согласуются с экспериментальными данными других авторов и качественно соответствуют стандартной теории сольватохромизма.

Список литературы / References:

1. Darzynkiewicz Z. Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. *Methods Cell Biol.*, 1990, vol. 33, pp. 285-298.
2. Costantino L., Guarino G., Ortona O., Vitagllano V. Acridine Orange Association Equilibrium in Aqueous Solution. *J. Chem. Eng. Data*, 1984, vol. 29, pp. 62-66.
3. Ferguson J., Mau A.W.H. Absorption studies of acid-base equilibria of dye solutions. *Chem. Phys. Lett.*, 1972, vol. 17, pp. 543-546.
4. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.
5. Sharma V.K., Sahare P.D., Rastogi R.C., Ghoshal S.K., Mohan D. Excited state characteristics of acridine dyes: acriflavine and acridine orange. *Spectrochim. Act. A.*, 2003, vol. 59, pp. 1799-1804.
6. Lagutschenkov A., Dopfer O. Infrared spectrum of a protonated fluorescence dye: Acridine orange. *J. Mol. Spectr.*, 2011, vol. 268, pp. 66-77.
7. Ito H., I'Haya Y.J. The electronic structures and spectra of proflavine, acridine orange, and their DNA complexes. *Int. J. Quant. Chem.*, 1968, vol. 2, pp. 5-21.
8. Yukio M., Kiwamu Y. Film Dichroism. II. Linearly-polarized Absorption Spectra of Acridine Dyes in the Stretched Poly (vinyl alcohol) Films. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1979, vol. 52, pp. 3163-3170.
9. Kiwamu Y., Mitsuaki S. Film Dichroism. VI. Linearly-polarized Absorption Spectra of Neutral and Divalent 3,6-Diaminoacridine Dyes in the Stretched Poly (vinyl alcohol) Film. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1983, vol. 56, pp. 55-59.
10. Foresman J.B., Frisch A.E. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, 3rd ed. - Gaussian, Inc., Wallingford, CT. 2015.

11. Cossi M., Barone V. Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions. *J. Chem. Phys.*, 2001, vol. 115, pp. 4708-4717.
12. Scalmani G., Frisch M.J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.*, 2010, vol. 132, p. 114110.
13. Xu X., Goddard W.A. The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, pp. 2673-2677.

ELECTRONIC STATES OF ACRIDINE ORANGE IN AQUEOUS SOLUTION

Kostyukova L.O.¹, Leontyeva S.V.¹, Voronin D.P.², Rybakova K.A.², Buchelnikov A.S.², Kostyukov V.V.²

¹ Nakhimov Black Sea Higher Naval School

Dybenko st., 1a, Sevastopol, 299028, Russia

² Sevastopol State University

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

Abstract. The electronic states of the acridine orange fluorescent dye molecule in cationic (protonated) and neutral forms in an aqueous solution were studied by the time-dependence density functional theory. Transitions between these states corresponding to absorption of dye molecules in the visible region of the spectrum are investigated. The dipole moments of the ground and excited states are calculated and analyzed from the point of view of the theory of solvatochromism.

Key words: *acridine orange, time-dependence density functional theory, polarizable continuum model, electronic transitions, molecular orbitals, solvatochromism.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ КРУПНЫХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Клочков Б.Н.

Институт прикладной физики РАН

ул. Ульянова, 46, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: klochkovbn@gmail.com

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. Проведен анализ распределенных колебаний упругого сосуда с протекающей в нем кровью и рассмотрены условия существования динамических эффектов. Получены дисперсионные характеристики волновых процессов. Показана возможность существования фиксированных структур, описаны условия возникновения неустойчивости.

Ключевые слова: упругий сосуд с жидкостью, характерные скорости течения, неустойчивость, структуры, математическое моделирование.

Кроме транспортной функции кровеносных сосудов в них могут происходить волновые и колебательные процессы, статические изменения формы, параметры которых могут служить диагностике состояния сосудистой системы [1-8]. При этом существенным является построение адекватной математической модели распределенных движений крови в отдельном сосуде с учетом накопленного экспериментального материала. Кровеносные сосуды в экспериментальных условиях часто моделируются мягкими упругими трубками, через которые прокачивается жидкость. При превышении скоростью потока некоторого критического значения наблюдались осцилляции трубки. Имеют место сосредоточенные и распределенные гидродинамические модели течения крови в сосудах конечной длины.

Рассмотрим волновые и колебательные процессы в системе сосуд–кровь и исследуем их параметры. Используем математическую модель сосуда с учетом упругости сосудистого русла, скорости потока жидкости. Движение стенки сосуда описываем уравнениями тонкостенной оболочки [9]. Материал стенки считаем несжимаемым. Пренебрегаем продольными и угловыми смещениями элемента оболочки по сравнению с радиальными. Это связано с функциональной спецификой сосудов в живом организме. Сосуд достаточно жестко закреплен в ткани в осевом и азимутальном направлениях с целью экономии энергетических ресурсов. Практически перемещения стенки сосуда осуществляются лишь радиально под действием давления, что вполне достаточно для изменения внутреннего просвета сосуда, в частности, для регуляции кровоснабжения тканей и органов. Уравнение движения элемента стенки в цилиндрических координатах имеет вид:

$$\frac{Eh^3}{9} \left(\frac{\partial^4 R}{\partial x^4} + \frac{2}{R_0^2} \frac{\partial^4 R}{\partial x^2 \partial \theta^2} + \frac{1}{R_0^4} \frac{\partial^4 R}{\partial \theta^4} \right) + \frac{4EhR}{3R_0^2} = P - \rho h \frac{\partial^2 R}{\partial t^2}, \quad (1)$$

где t – время; x – продольная, θ – азимутальная координаты; E – модуль упругости материала стенки сосуда; h – толщина стенки; R – текущее изменение радиуса, R_0 – недеформированный радиус; P – текущее изменение внутреннего давления; ρ – плотность материала стенки. В стенку сосуда могут входить гладкомышечные волокна и параметр E может меняться как в сторону увеличения, так и уменьшения в зависимости от уровня активации волокон.

Уравнение для давления P в (1) следует из анализа гидродинамических уравнений [9]. Считаем кровь несжимаемой. Векторная скорость крови $\mathbf{V} = \nabla \varphi + \mathbf{U}$, где φ – потенциал скоростей, $\mathbf{U}$ – постоянная составляющая скорости. Используем уравнение Лапласа для потенциала скоростей, граничное условие непроницаемости на внутренней поверхности сосуда стенка–кровь, интеграл Коши–Лагранжа (ρ_f – плотность крови). Решая уравнение Лапласа в виде $\varphi = f(r) \times \exp[i(\Omega t - kx - n\theta)]$, где Ω – частота, k – волновое число, n – номер азимутальной моды, получим модифицированное уравнение Бесселя для $f(r)$. Его ограниченное решение представляется в виде модифицированной функции Бесселя первого рода I_n с точностью до постоянного множителя: $f(r) \sim I_n(kr)$. Из условия непроницаемости на стенке следует выражение для давления, причем $\alpha = kR_0$, $(\cdot)$ – производная:

$$P = -\rho_f R_0 \Phi(\alpha, n) \left(\frac{\partial^2 R}{\partial t^2} + 2U \frac{\partial^2 R}{\partial x \partial t} + U^2 \frac{\partial^2 R}{\partial x^2} \right), \quad \Phi(\alpha, n) = \frac{I_n(\alpha)}{\alpha I_n'(\alpha)}. \quad (2)$$

Анализ линейной стадии важен для биососудов, поскольку позволяет получить необходимые аналитические выражения и их зависимости от параметров рассматриваемой системы. Сделаем преобразования, переходя к безразмерным: частоте $\zeta = \Omega R_0 / c$, волновому числу $\alpha = kR_0$ и другим параметрам. Приходим к искомому дисперсионному уравнению, причем $\rho \approx \rho_f$:

$$[1 + \varepsilon(\alpha, n)] \zeta^2 - 2\varepsilon(\alpha, n) \alpha W \zeta + \varepsilon(\alpha, n) \alpha^2 W^2 - \delta(\alpha^2 + n^2)^2 - 1 = 0, \quad (3)$$

$$\varepsilon(\alpha, n) = \frac{1}{q} \Phi(\alpha, n), \quad q = \frac{h}{R_0}, \quad \delta = \frac{q^2}{12}, \quad W = \frac{U}{c}, \quad c = \sqrt{\frac{4E}{3\rho}}. \quad (4)$$

Решение квадратного уравнения (3) с выражениями (4) имеет два корня:

$$\zeta(\alpha, n) = \frac{\varepsilon(\alpha, n)\alpha W}{1 + \varepsilon(\alpha, n)} \pm \sqrt{N(\alpha, n)}, \quad N(\alpha, n) = -\frac{\varepsilon(\alpha, n)(\alpha W)^2}{[1 + \varepsilon(\alpha, n)]^2} + \frac{\delta(\alpha^2 + n^2)^2 + 1}{1 + \varepsilon(\alpha, n)}. \quad (5)$$

Полученные решения описывают колебательные эффекты изменения просвета сосуда в распределенной модели упругого сосуда с кровью, подобной артерии, вене или другому сосуду, причем знак (+) соответствует устойчивой ветви, а знак (–) – неустойчивой. При возникновении неустойчивости ($N < 0$) частота нарастающих колебаний $\text{Re}\zeta$ линейно растет со скоростью потока W , что соответствует экспериментальным данным. При определенных условиях возможны неподвижные структуры. В качестве основного параметра возьмем гидродинамический – скорость жидкости размерная U или безразмерная W . Существуют по крайней мере две характерные скорости, приводящие к существенным эффектам.

Во-первых, получим выражение для критической скорости потока жидкости U_{cr} и частоты колебаний Ω_{cr} при возникновении неустойчивости в трубке с жидкостью в случае $N \leq 0$ при $U \geq U_{cr}$. Это – проявление неустойчивости Кельвина–Гельмгольца. При этом размерная критическая скорость потока U_{cr} , когда $N=0$, равна:

$$U_{cr}(\alpha, n) = c \sqrt{\frac{1 + \delta(n^2 + \alpha^2)^2}{\alpha^2 \varepsilon(\alpha, n)}} [1 + \varepsilon(\alpha, n)]. \quad (6)$$

Величина U_{cr} (6) монотонно растет с ростом продольного натяжения и окружного натяжения (при их учете), а также с ростом модуля упругости Юнга E и толщины стенки сосуда h . Безразмерная критическая скорость $W_{cr}(\alpha, n)$ при пренебрежении продольным и окружным постоянными натяжениями, а также с учетом близких значений плотностей протекающей крови и материала стенки сосуда имеет упрощенный вид. Характерной особенностью этой зависимости является то, что $W_{cr}(\alpha, n)$ определяется в основном только одним параметром q (относительная толщина стенки сосуда) и растет с ним, а она же размерная $U_{cr}(\alpha, n)$ – еще и упругостью материала стенки E . В частном случае $n=0$ и $\alpha \ll 1$ можно получить, что $W_{cr}(\alpha, 0) \approx 1/\alpha$. При $U=U_{cr}$ имеем критическую частоту осцилляций в безразмерном виде:

$$\zeta_{cr}(\alpha, n) = \sqrt{\frac{12 + q^2(n^2 + \alpha^2)^2}{12}} \cdot \frac{\Phi(\alpha, n)}{q + \Phi(\alpha, n)}. \quad (7)$$

Минимальные частоты соответствуют длинам волн $\lambda_{cr}^{cr} \approx (2 \div 3)R_0$. При $n=0$ и $\alpha \ll 1$ получаем, что $\zeta_{cr}(\alpha, 0) \approx 1$. Дисперсионные зависимости в комплексном виде можно представить как $\zeta(\alpha, n) = \text{Re}\zeta(\alpha, n) + i\text{Im}\zeta(\alpha, n)$. Неустойчивость имеет место в некотором диапазоне волновых чисел $\alpha_1 \leq \alpha \leq \alpha_2$, причем $N(\alpha_{1,2}, n) = 0$. При этом длина волны в этой области лежит в пределах $\lambda_{1,2} \approx R_0 \div 1.4R_0$. При увеличении номера моды n при фиксированных остальных параметрах характер зависимостей сохраняется, но область неустойчивости сужается, величины инкремента и декремента уменьшаются, причем в дальнейшем неустойчивая и затухающая мнимые ветви обращаются в нуль, а частотные действительные ветви становятся непересекающимися. Выражение для инкремента колебаний при $W > W_{cr}$ имеет вид: $\text{Incr}(\alpha, n) = \text{Im}[\zeta(\alpha, n)] = \sqrt{-N(\alpha, n)}$, откуда видно, что $\text{Incr}(\alpha, n)$ растет монотонно с увеличением скорости потока крови W .

Во-вторых, рассмотрим случай нулевой скорости распространения волны или, что тоже самое, случай нулевой частоты $\zeta(\alpha, n) = 0$. При $C(\alpha, n) = 0$, остановившаяся волна, инкремент и декремент – тоже нулевые, существует эффект статики. Здесь возможны: редкая, пространственно низкочастотная гофра для $n \geq 1$ и частая, пространственно высокочастотная гофра для $n \geq 0$. Получаем выражение для своеобразной безразмерной критической скорости структурирования W_{0cr} достижения стоячей гофры:

$$W_{0cr} = \sqrt{q \frac{12 + q^2(n^2 + \alpha^2)^2}{12\alpha^2 \Phi(\alpha, n)}}. \quad (8)$$

Критическая скорость кровотока W_{0cr} (8) для остановленных мод меньше, чем критическая скорость возникновения неустойчивости W_{cr} для неустойчивых мод: $W_{cr}=W_{0cr}\sqrt{1+\varepsilon(\alpha,n)}$ примерно в 2 раза по минимуму, то есть в реальности легче получить фиксированную извитость сосуда, чем его колебания. В приближении $\alpha \ll 1$ и при $n=0$ получаем выражение для $W_{0cr} \approx \sqrt{q/2}$.

В-третьих, существует зависимость безразмерной фазовой скорости распространения возмущений от безразмерного волнового числа α и номера моды n :

$$C(\alpha,n)=\text{Re}\zeta(\alpha,n)/\alpha. \quad (9)$$

Это – обобщение частного случая формулы Юнга–Моеенса–Кортевега для скорости пульсовой волны. При этом для реальной пульсовой волны ее длина сравнима с размером тела из-за достаточно низкой частоты сердечного пульса, однако для вынужденного волнового воздействия частоту можно увеличить. Из полученной формулы в длинноволновом приближении $\alpha \ll 1$ следует простое бездисперсионное выражение для размерной скорости распространения пульса при $W=n=0$:

$$C_0=\sqrt{2hE/(3R_0\rho_f)}. \quad (10)$$

В нормальных условиях скорость течения крови в крупных артериях может достигать 1,5÷2,9 м/с, а при некоторых патологиях может значительно увеличиваться [3-6]. Кроме того, существуют заболевания, связанные с уменьшением модуля Юнга материала стенки сосуда, что приводит к снижению критической скорости U_{cr} . Максимальная скорость крови в крупных венах может составлять 0,5 м/с. Частоты звуковых колебательных эффектов в системе сосуд–кровь составляют 25-500 Гц [3, 4]. Необходимо различать условия содержания сосуда, у сосудистых препаратов из-за их физико-химической обработки значения модуля упругости E могут существенно превышать соответствующие в живом действующем состоянии. В [3, 10, 11] приведены довольно низкие значения модуля упругости $E \approx 10^2 \div 5 \times 10^4$ Н/м². Вместе с этим существуют и данные значительно большие приведенных. Характерные значения радиуса для рассматриваемых сосудов лежат в пределах $(0,1 \div 1,2) \times 10^{-2}$ м. Критические скорости существенно падают с уменьшением q , минимальные значения составляют $q \approx 0,02 \div 0,04$. Измеренная скорость распространения пульсовой волны составляет: 4÷14 м/с для крупных артериальных сосудов и 1÷2 м/с для крупных венозных сосудов [5, 6].

Оценки можно сделать при помощи полученных в настоящей статье формул и выражений для нулевой моды $n=0$ и нулевых продольных и азимутальных напряжений, близких значениях плотностей крови и водоподобной ткани стенки сосуда $\rho \approx \rho_f \approx 1000$ кг/м³. Так, при $q=0,02$, $E=4 \times 10^3$ Н/м², $R_0=3 \times 10^{-3}$ м минимальная критическая скорость неустойчивости равна $U_{cr}=0,28$ м/с согласно формуле (6), соответствующая частота $f_{cr}=\Omega_{cr}/2\pi=153$ Гц (7), минимальная критическая скорость структурирования $U_{0cr}=0,12$ м/с (8). Оценка скорости пульса в области устойчивости согласно формуле (9) при $q=0,04$, $E=5 \times 10^4$ Н/м², $U=0,1$ м/с, $\alpha=0,1$ составляет $C=1,25$ м/с.

Сделанные оценки показывают правдоподобность результатов для венозных и артериальных сосудов в норме и при ряде патологий. Заметим, что в живом организме может происходить прорастание ткани, прорастающие деформации, и этот более медленный процесс может взаимодействовать с динамикой системы сосуд–кровь, «закреплять» статическую извитость. Когда сосуды прямые и чистые, то это хорошо с точки зрения кровоснабжения, а любой изгиб, извитость сосуда может привести к дальнейшим нарушениям гидродинамики и прочим патологическим процессам [12, 13]. Представлен линейный волновой подход к проблеме динамической биомеханики сосудов. Получены дисперсионные характеристики и выражение для частоты колебаний. Выведены формулы для двух критических скоростей тока крови: для структурирования сосуда и для его неустойчивости. Проведенные для крупных кровеносных сосудов оценки показывают возможность возникновения в них как статического и квазистатического режима (малые частоты), так и режима колебаний (относительно высокочастотные вибрации). Критические скорости кровотока могут достигаться для вен в обычных условиях, а для артерий – при функциональных или диагностических сдавливаниях, а также при патологии, характеризующейся значительно большей, чем в обычных условиях, скоростью течения крови, либо меньшей упругостью сосуда.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИПФ РАН, проект № 0035-2014-0008.

Список литературы / References:

1. Cancelli C., Pedley T.J. A separated-flow model for collapsible-tube oscillations. *J. Fluid. Mech.*, 1985, vol. 157, pp. 375-404.
2. Gavriely N., Shee T.R., Cugell D.W., Grotberg J.B. Flutter in flow-limited collapsible tubes: a mechanism for generation of wheezes. *J. Appl. Physiol.*, 1989, vol. 66, no. 5, pp. 2251-2261.

3. Каро К., Педли Т., Шротер Р., Сид У. *Механика кровообращения*. М.: Мир, 1981, 642 с. [Caro C.G., Pedley T.J., Schroter R.C., Seed W.A. *The mechanics of the circulation*. Oxford: Oxford University Press, 1978. (In Russ.)]
4. Педли Т. *Гидродинамика крупных кровеносных сосудов*. М.: Мир, 1983, 400 с. [Pedley T.J. *The fluid mechanics of large blood vessels*. Cambridge: Cambridge University Press, 1980. (In Russ.)]
5. *Физиология кровообращения: физиология сосудистой системы. Руководство по физиологии*. Л.: Наука, 1984, 656 с. [Circulation physiology: vessel system physiology. Guide on physiology. L.: Nauka, 1984, 656 p. (In Russ.)]
6. *Физиология человека*. Под ред. Шмидта Р., Тевса Г. М.: Мир, 1986, т. 3, 288 с. [Human physiology. Ed. Schmidt R.F., Thews G. Berlin: Springer-Verlag, 1983. (In Russ.)]
7. Griffiths D.J. Oscillations in the outflow from a collapsible tube. *Med. Biol. Engng. and Comput.*, 1977, vol. 15, no. 4, pp. 357-362.
8. Brower R.W., Scholten C. Experimental evidence on the mechanism for the instability of flow in collapsible vessels. *Med. Biol. Engng.*, 1975, vol. 13, no. 6, pp. 839-845
9. Вольмир А.С. *Оболочки в потоке жидкости и газа: задачи гидроупругости*. М.: Наука, 1979, 320 с. [Volmir A.S. *Shells in flow of liquid and gas: problems of fluid-elasticity*. M.: Nauka, 1979, 320 p. (In Russ.)]
10. Ohhashi T., Azuma T., Sakaguchi M. Active and passive mechanical characteristics of bovine mesenteric lymphatics. *Amer. J. Physiol.*, 1980, vol. 239, pp. H88-H95.
11. Березовский В.А., Колотилов Н.Н. *Биофизические характеристики тканей человека. Справочник*. Киев: Наук. Думка, 1990, 224 с. [Berezovsky V.A., Kolotilov N.N. *Human tissues biophysical characteristics. Handbook*. Kiev: Nauk. Dumka, 1990, 224 p. (In Russ.)]
12. Клочков Б.Н., Кузнецова Е.А. Нелинейные режимы изменения формы упругой трубки с потоком жидкости в ней. *Изв. АН. Механика жидкости газа*, 2000, № 4, с. 46-55 [Klochkov B.N., Kuznetsova E.A. Nonlinear regimes of variation of the shape of a collapsible tube containing a flowing fluid. *Izv. Ross. Akad. Nauk. Mekh. Zhidk. Gaza*, 2000, no. 4, p. 46-55. (In Russ.)]
13. Клочков Б.Н., Елисеева Ю.Ю., Шилягин П.А. Распространение низкочастотных волн в биологических тканях и сосудах. *Акустический журнал*, 2009, т. 55, № 4-5, с. 506-515 [Klochkov B.N., Eliseeva Yu.Yu., Shilyagin P.A. Propagation of low-frequency waves in biological tissues and vessels. *Akust. Zh.*, 2009, vol. 55, no. 4-5, p. 506-515. (In Russ.)]

MODELING OF DYNAMICS IN LARGE BLOOD VESSELS

Klochkov B.N.

Applied Physics Institute, Russian Academy of Sciences

Ulyanova str., 46, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: klochkovbn@gmail.com

Abstract. Analyse of distributed oscillations of soft elastic vessel with blood flow in it is supplied and conditions of dynamic effects existence are considered. Dispersion characteristics of wave processes are given. The possibility of the existence of fixed structures is shown, conditions of instability rise are described.

Key words: elastic vessel with fluid, characteristic velocities of stream, instability, structures, mathematical modeling.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ПУЛДИС энергет Р и ПУЛДИС герпофф К НА ЭНЕРГЕТИКУ И ИХ РОЛЬ В ПРОФИЛАКТИКЕ СТАРЕНИЯ И ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Касумов Э.А., Касумов Р.Э., Касумова И.В.

Научно-производственный центр «КОРВЕТ»

г. Домодедово, РФ; e-mail: kasumov_eldar@mail.ru

Поступила в редакцию: 05.07.2020

Аннотация. Несмотря на усилия ученых проблемы преждевременного старения, а также болезней таких, как рак, диабет, опоясывающий герпес, остеопороз и других до сих пор остаются нерешенными. Соединения гуанидина оказывают сильное действие на эти процессы. Согласно, нами разработанному механо-хемиосмотическому механизму, трансформация энергии как при синтезе, так и при гидролизе АТФ происходит при прямом участии аминокислотных остатков аргинина (физиологического соединения гуанидина) и лизина. Кроме того, аргинин и лизин участвуют во многих процессах в метаболизме клетки. Поскольку аргинин в организме синтезируется до 28-30 лет, мы считаем, что старение начинается с уменьшением синтеза аргинина. После этого возраста необходимо поддерживать содержание аргинина в организме принимая его экзогенно, а содержание лизина - незаменимой аминокислоты, должно пополняться постоянно. С этой целью нами разработаны и зарегистрированы биологически активные добавки - препараты ПУЛДИС энергет Р и ПУЛДИС герпофф К, содержащие L-аргинин и L-лизин, соответственно. В связи с этим предлагаем рецепт здорового долголетия.

Ключевые слова: механо-хемиосмотический механизм, старение, болезнь, лизин, аргинин.

В современной медицине преждевременное старение, а также болезни, такие как рак, диабет, опоясывающий герпес, остеопороз и другие являются актуальными и неразрешенными проблемами. Многие ученые не сомневаются в том, что в основе этих и других болезней лежит нарушение энергетического статуса организма. Организм получает основную энергию в виде АТФ (около 50 кг в сутки), в основном, от окислительного фосфорилирования в митохондриях, а небольшую часть от гликолиза. В раковых клетках основная энергия получается от гликолиза с последующим образованием молочной кислоты (эффект Варбурга). В клетках быстро растущей злокачественной опухоли уровень гликолиза почти в 200 раз выше, чем в нормальных тканях. При этом гликолиз остаётся предпочтительным даже в условиях избыточного кислорода [1]. До сих пор остается неизвестным механизм эффекта Варбурга, где подавляется функция митохондрий (митохондрии находятся в набухшем состоянии), что приводит к деполаризации внутренней мембраны и открытию пор высокой проницаемости [2].

При сравнительном электронно-микроскопическом исследовании ультраструктуры митохондрий в скелетных мышцах 3- и 24-месячных крыс Wistar и OXYS были выявлены возрастные изменения как общей организации митохондриального ретикулума, так и ультраструктуры митохондрий. Наиболее выраженные ультраструктурные изменения были обнаружены у крыс OXYS, страдающих от постоянного окислительного стресса. Существенные изменения ультраструктуры митохондрий были обнаружены уже в возрасте 3 месяцев. Было обнаружено появление мегамитохондрий с уменьшением крист, что привело к образованию областей без крист внутри митохондрий. У 24-месячных крыс OXYS митохондриальный ретикулум был полностью разрушен. Митохондриальный антиоксидант SkQ1 (положительно заряженный 10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium) предотвращал развитие возрастных деструктивных изменений у крыс Wistar и OXYS [3]. Предполагается, что причиной возникновения рака и старения является избыточное количество активной формы кислорода (АФК), которое образовывается, по нашему мнению, в митохондриях с набухшим внутрикристным пространством. В соответствии с этим, образование АФК было экспериментально продемонстрировано при гипоксии [4], в то время как эпизодическая гипоксия обеспечивает защиту от клеточного стресса и апоптоза, снижая АФК [5]. Гипоксия имеет двойственную природу, в зависимости от ее степени, продолжительности и времени. Аналогичное явление наблюдается, также при длительной гипоксии.

Хорошо известно, что в органах, нуждающихся в большом количестве АТФ, митохондрии правильно расположены вокруг миофибрилл и кристы в них расположены как «монетный столбик». При гипоксии на 5-7-е сутки после перевязки коронарной артерии в мышечных волокнах миокарда обнаруживается большое число митохондрий, с плотно упакованными кристами и с цитохром С-оксидазной активностью. Обводненные же митохондрии в результате гипоксии лишаются такой активности, но в них образуются мелкие митохондрии, с плотно упакованными кристами, обладающие цитохром С-оксидазной активностью [6]. Митохондрии растений приобретают параллельную упаковку крист при гипоксии до 4 суток [7]. Изолированные митохондрии сохраняют способность к циклическому набуханию-сокращению и в присутствии субстрата окисления мембраны крист митохондрий находятся в тесно сближенном состоянии. Более того, при исчерпании кислорода из среды инкубации, т.е. при наступлении гипоксии в среде инкубации изолированные митохондрии сами сокращаются [8]. По мнению Высоких и др. [9] образование АФК находится в тесной связи со слабой деполаризацией внутренней митохондриальной мембраны, что является важнейшим компонентом антивозрастной программы.

Подобно слабой деполяризации, SkQ1 снижает уровень АФК, особенно в митохондриях [9]. В то же время, авторы отмечают, что, к сожалению, детали молекулярного механизма образования АФК остаются непонятными и считают, что участок образования АФК находится в Комплексе I. Однако, как известно [10], и как мы утверждаем, образование АФК в митохондриях должно происходить в участках переносчиков ЭТЦ вплоть до, включая цитохром bc_1 комплекса, согласно механо-хемиосмотическому механизму сопряжения [11], где электрон переходит от $[2Fe-2S]$ кластера одного димера на гем c_1 другого димера цитохрома bc_1 комплекса, расположенного на противоположной стороне мембраны крист при сокращении митохондрий. К тому же слабая деполяризация является одной из компонентов механо-хемиосмотического механизма сопряжения синтеза АТФ, переноса электронов и низкоамплитудного набухания-сокращения митохондрий, где последнее выполняет регуляторную функцию переноса электронов, следовательно, образования АФК [12]. Таким образом, эти процессы находятся под контролем митохондрий, где основную роль играет структура и, следовательно, функция митохондрий. Однако, из-за отсутствия фундаментальных знаний механизма синтеза АТФ в митохондриях и его связи со структурными изменениями митохондрий в настоящее время невозможно решить проблемы ни многих болезней, ни старения. В итоге, поиск лекарств в этих областях носит случайный характер и не опирается на научные знания, которые, к сожалению, отчасти и отсутствуют. Например, случайно установлено, что метформин (N, N-диметилимиддикарбоимид диамида – класс бигуанидов), один из самых известных препаратов от инсулиннезависимого диабета, значительно, едва ли не в половину, уменьшает вероятность заболеть раком [13]. Было известно, что антидиабетическое действие метформина связано с митохондриями, но о его антиоксидантных свойствах никто не догадывался [14]. Предполагается, что препарат действует не совсем аналогично другим антиоксидантам. Вместо того чтобы ловить и нейтрализовать кислородные радикалы, он предотвращает их продукцию, восстанавливая функцию поврежденных митохондрий. В то же время остается неясным механизм действия метформина и других препаратов на митохондрии, что показывает важную роль фундаментальных исследований в разработке лекарственных препаратов, которые помогут организму справиться с онкологическими заболеваниями и замедлить старение организма [15]. В митохондриях сердца человека метформин ингибировал открытие пор высокой проницаемости, которое в противном случае приводит к энергетической недостаточности митохондрий и гибели клеток [16].

Наши исследования влияния гуанидина на митохондрии [17] показали, что в отличие от бигуанидина и алкилгуанидинов, требуются большие концентрации гуанидина, но характер действия остается таким же. Как показано на рисунке 1, гуанидин ингибирует дыхание как в состоянии 3, так и в состоянии 4, при этом с увеличением концентрации гуанидина увеличивалось ингибирование дыхания. В то же время, ингибирование дыхания в состоянии 3 было больше, что указывает на отсутствие фосфорилирования в этих условиях. В ответ на добавление АДФ к митохондриям в присутствии сукцината подавляется также сокращение митохондрий (рис. 2), которое является одной из характеристик сопряжения циклического низкоамплитудного набухания-сокращения митохондрий и окислительного фосфорилирования. Согласно нашим разработкам механо-хемиосмотическому механизму [11] сопряженными являются: перенос электронов по ЭТЦ, перенос протонов, передвижение катионов, низкоамплитудное набухание - сокращение и синтез АТФ. При этом функционирование АТФ-синтазы идет параллельно с циклическим набуханием-сокращением митохондрий, циклическим изменением pH, как матрикса (от щелочных pH до pH 7 и обратно), так и межмембранного пространства (от кислых pH до pH 7 и обратно). В регулировании pH может играть активную роль, в том числе карбоангидраза.

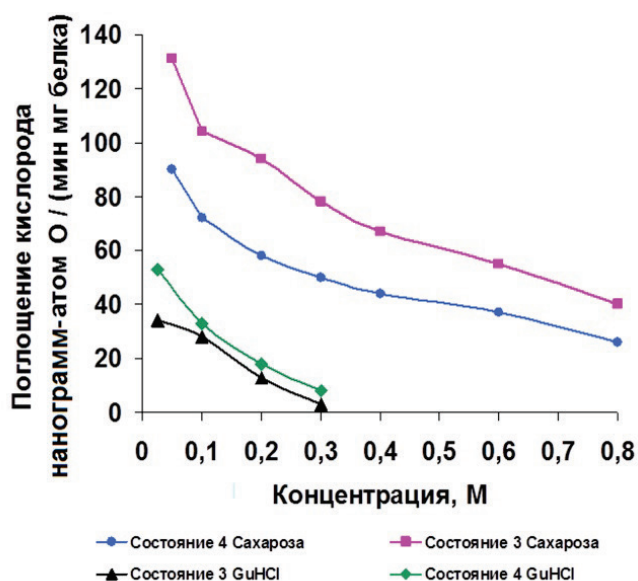


Рисунок 1. Сравнение действия разных концентраций сахарозы и гуанидина на состояние 3 и 4 дыхания митохондрий [17]

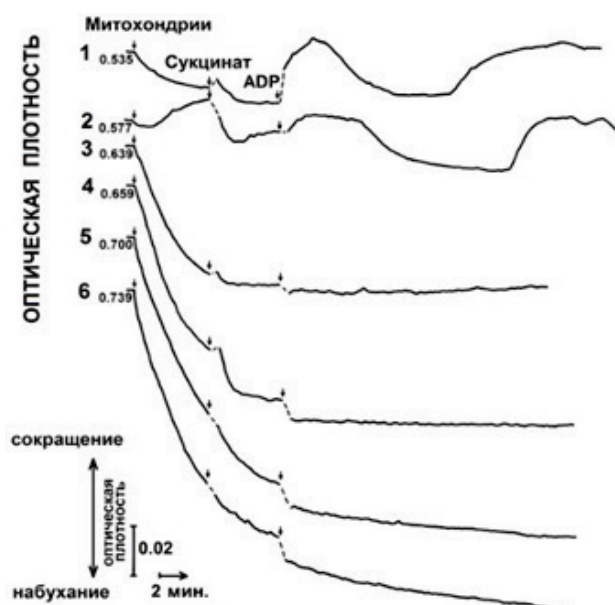


Рисунок 2. Кинетические кривые изменения объемов митохондрий в контроле 1) 0,4М сахароза; 2) 0,35М сахароза и 0,025М GuHCl; 3) 0,025 М GuHCl; 4) 0,1 М GuHCl; 5) 0,2 М GuHCl; 6) 0,3 М GuHCl [17]

Механо-хемиосмотический механизм позволяет также раскрыть новый механизм трансформации энергии как при синтезе, так и при гидролизе АТФ [18]. При нейтрализации протонов выделяется энергия [19], которая, по нашему мнению, расходуется для функционирования АТФ-синтетазы и для синтеза АТФ. Таким образом, в процессе синтеза АТФ энергия нейтрализации ионов используется для электростатических взаимодействий и запасается в виде протона и иона фосфата в молекуле АТФ, и наоборот, во время гидролиза АТФ образуются протон, ион фосфата и АДФ. Эти протоны изменяют pH к нейтральной величине (опять энергия получается за счет нейтрализации зарядов), вследствие чего происходит фосфатизация положительно заряженных аминокислотных остатков (лизинов и аргининов), где за счет электростатического взаимодействия одноименных зарядов в электрическом поле выполняется работа (основным условием является наличие двух скрученных нитей с большим количеством лизина или аргинина), например, вращение γ -субъединицы по противочасовой стрелке, скручивание b_2 субъединиц, сокращение мышечного волокна [20], движение цитоплазмы с участием актиновых филаментов [21] и др. (схематически показано на рис. 3). В результате дефосфатизации под действием ионов кальция γ -субъединица вращается обратно по часовой стрелке, тогда как b_2 субъединицы раскручиваются и отдаляют $\alpha_3\beta_3$ -гексамер от мембраны. Увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и его взаимодействие с микрофиламентными структурами цитоскелета могут объяснить замедление и остановку движения цитоплазмы [21, 22], что указывает на идентичный механизм вышеуказанных процессов.

Схематически сокращение двух скрученных нитей показано на рисунке 3. При pH 7.0 остатки аргининов и лизинов протонируются и несут положительный заряд. Присоединение к ним ионов фосфата приводит к отрицательному заряду двух скрученных альфа спиральных нитей, где нити сокращаются, отталкиваясь друг от друга. Добавление к ним ионов кальция и изменение pH в щелочную область, приводит к дефосфатизации остатков аргининов и лизинов, следовательно, к раскручиванию альфа спиральных нитей. По нашему мнению, такой же механизм имеет место при трансформации энергии при мышечном сокращении при гидролизе АТФ, который является источником ионов водорода. Механизм действия ионов гуанидина может заключаться в том, что ионы гуанидина закачиваются через c -кольцо АТФ-синтетазы в межмембранное пространство вместо ионов кальция. В межмембранном пространстве гуанидин протонируется и связывается с фосфолипидами, в результате уменьшается мембранный потенциал и увеличивается лаг фаза реполяризации. В матриксе протонированный гуанидин связывается вместо ионов кальция с γ - и b_2 -субъединицами (F_1) АТФ синтетазы [23], где не происходит вращения γ -субъединицы и скручивание b_2 -субъединиц под влиянием ионов фосфата. АТФ синтезируется в нормальных условиях при обратном вращении γ -субъединицы и раскручивании b_2 -субъединиц дефосфатизацией под влиянием ионов кальция, которые перекачиваются из межмембранного пространства при его набухании. В присутствии ионов гуанидина добавление АДФ должно вызывать деполяризацию, но синтез АТФ не происходит из-за отсутствия энергизованно-скрученного состояния митохондрий. Мы считаем, что алкилгуанидины [23, 24], в отличие от гуанидина, взаимодействуют в протонированной форме с внутренней мембраной и нарушают передвижение ионов. В связи с тем, что соединения гуанидина подавляют фосфорилирующую активность митохондрий, митохондрии в раковых клетках находятся в набухом состоянии и менее активны [2], то можно предположить, что гуанидины могут проникать в «кислые» раковые клетки и восстанавливать функцию митохондрий с последующим апоптозом, тем самым восстанавливая контроль митохондрий над гликолизом, главным поставщиком энергии в раковых клетках. В то же время, физиологически

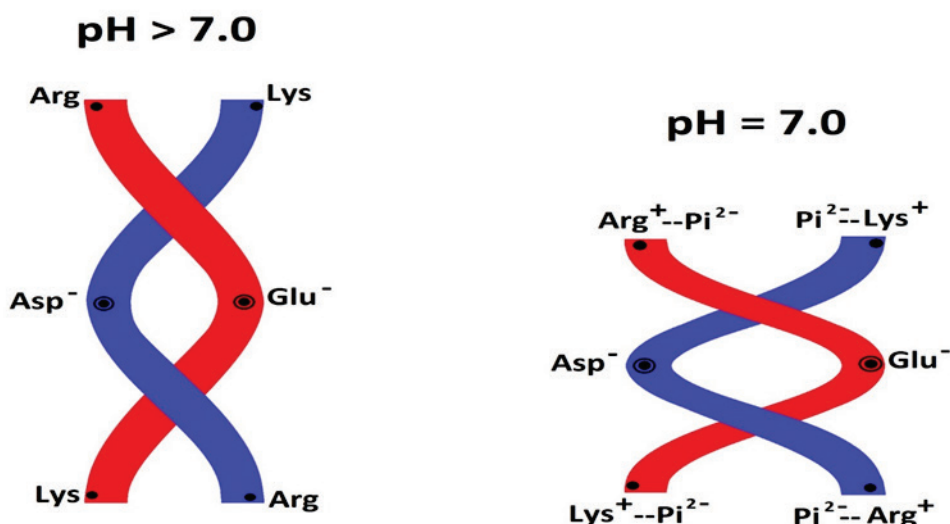


Рисунок 3. Схематическое изображение сокращения и удлинения двух скрученных нитей в зависимости от pH

активные соединения гуанидина (например, аргинин) могли бы восстановить функцию митохондрий в раковых клетках, не оказывая негативного влияния на здоровые клетки. L-аргинин играет очень важную роль в многочисленных физиологических процессах [25]. Аргинин является стимулятором гормона роста и после 28 лет у людей синтез аргинина резко уменьшается. При дефиците аргинина в организме снижается синтез АТФ в митохондриях, а потеря энергии компенсируется с помощью гликолиза, сопровождавшегося появлением диабета 2 типа. В таких условиях внутриклеточное пространство митохондрий находится в набухом состоянии, где такая структура способствует образованию активной формы кислорода (АФК) в цитохром bc_1 комплексах в больших количествах. Излишки АФК вызывают мутации ДНК, что приводит к возникновению рака. Кроме того, фактор 2 теломера содержит аргинин [26], метилирование которого регулирует длину и стабильность теломера, значит, дефицит аргинина будет влиять, также, на длину теломера. Таким образом, одной из основных причин старения является снижение синтеза эндогенного аргинина, в результате чего, возникает дефицит аргинина, что приводит к нарушению многих физиологических процессов. Дефицит же лизина, незаменимой аминокислоты, создает гораздо больше проблем из-за не регулярного поступления его в организм, особенно взрослым людям.

Для решения проблемы поиска препаратов против онкологических болезней, старения и некоторых других мы предлагаем иной подход, в отличие от тех, имеющих в арсенале исследователей. Согласно механо-хемиосмотическому механизму [11] (анимация: [youtube.com/watch?v=CeZxSyeDBwk](https://www.youtube.com/watch?v=CeZxSyeDBwk)) в функционировании АТФ синтетазы играют важную роль остатки аргинина и лизина, которые содержатся, также в больших количествах в гистоновых белках, мышечном актине, участвуя в трансформации энергии. Нами разработаны и зарегистрированы препараты ПУЛДИС энергет Р и ПУЛДИС герпофф К, содержащие L-аргинин и L-лизин, соответственно.

Биологически активная добавка к пище «ПУЛДИС энергет Р» (PULDIS energet R).

Свидетельство о государственной регистрации: RU.77.99.88.003.R.000321.02.20 от 10.02.2020

В состав биологически активной добавки к пище «ПУЛДИС энергет Р» входит L-аргинин - условно незаменимая алифатическая основная (щелочная) аминокислота, синтезируемая в организме человека до 28 – 30 лет. «ПУЛДИС энергет Р» предназначен для восполнения дефицита аминокислоты L-аргинина, выполняющего в организме множество функций [27].

L-аргинин, участвует в трансформации энергии в организме; в синтезе АТФ в митохондриях и гидролизе АТФ в мышцах; как аргинин фосфат в качестве макроэргического соединения; улучшает доставку креатина в мышцы; входит в состав ферментов, гормонов, пептидов и основных белков (гистонов и протаминов), образуя ионные связи с фосфатными группами ДНК обуславливает образование нуклеопротеидов (комплексов гистон-ДНК хроматина и протамин-ДНК гетерохроматина сперматозоидов). L-аргинин – единственный в организме источник окиси азота (NO), образующийся с помощью фермента NO-синтазы [28]. Это соединение участвует во всех обменных процессах организма. Без окиси азота невозможно нормальное функционирование нервной и иммунной систем.

Окись азота поступает в кровь, которая разносит её по всему организму. Вместе с окисью азота кровь распределяет по организму кислород и элементы железа. Основное количество окиси азота поступает в головной мозг и в нервные окончания. Там это соединение отвечает за передачу нервных импульсов, регулирование мыслительной деятельности. Окись азота расслабляет сердечную мышцу, мышечные ткани и мышцы других внутренних органов. Окись азота помогает очищать сосуды от свободных радикалов, образующихся в них при окислении холестерина. В результате сосуды становятся более эластичными и проницаемыми, кровь по таким сосудам течёт свободно. Такая кровь более насыщена кислородом, который, так необходим для нормальной работы сердца. Известно, что все процессы, происходящие в организме взаимосвязаны, так, например, за

процессы полового развития и полового влечения отвечает гормон, вырабатываемый гипофизом - адренокортикотропный. Этот гормон стимулирует кору надпочечников, а она уже вырабатывает половые гормоны. Если организм получает недостаточное количество аргинина, участвующего в образовании гормонов, гипофиз отвечает на это уменьшением количества гормонов, выделяемых в кровь. Следствием такого снижения могут быть замедление роста у детей, снижение полового влечения у взрослых, замедление развития вторичных половых признаков у подростков (рост грудных желез, характерный тембр голоса, волосы на лице). Следствием отказа гипофиза стимулировать определённые отделы коры надпочечников, вырабатывающих тестостерон, может оказаться импотенция. Употребление L-аргинина способно стимулировать работу гипофиза и коры надпочечников, вызывать прилив крови к наружным половым органам, восстанавливая утраченные половые функции. Ослабление иммунитета – проблема не только ВИЧ инфицированных людей. Угнетение иммунной системы – причина очень многих заболеваний: аллергические реакции и склонность к частым простудам, нарушение обмена веществ, грибковые заболевания, туберкулёз, пневмония, рак. Наш организм ежедневно подвергается факторам, ослабляющим иммунитет. Это радио- и ультра- излучения, плохое качество питьевой воды, частый приём антибиотиков, неправильное питание, одежда из синтетических тканей, синтетические моющие средства. В общих чертах работу иммунной системы можно обрисовать так – как только чужеродный вирус попадает к нам в организм, на борьбу с ним устремляются особые клетки, призванные обезвредить чужака. Клеток этих – множество. И на каждый их вид возлагается определённая задача. Среди них Т-клетки, которые определяют вид чужеродного вируса. Т-клетка определяет вирус и даёт команду «киллеру» - обезвредить врага. Киллером называют NK-клетки (натуральный киллер). При ослаблении иммунитета угнетается деятельность Т и NK клеток. Употребление «ПУЛДИС энергет Р» способно активировать иммунную систему, повышая уровень NK-клеток, и Т-клеток в крови.

К сожалению, травмы - постоянный спутник человека в его жизни. Травмированному, повреждённому организму необходимо поступление новых белков в больших количествах, чем здоровому. L-аргинин способствует строительству новых тканей, ускоряя заживление. Например, при ожогах, организму требуется непомерно большое количество энергии, которую он направляет на восстановление повреждённых тканей. Энергию организм потребляет, разлагая в т.ч. белки. В повреждённом организме начинает быстро расходоваться аргинин – окисляться, образуя окись азота, которая так необходима для восстановления повреждённых тканей. При недостаточном количестве аргинина в организме (был потрачен на строительство новых белков и на создание окиси азота) – начинается самоотравление, т.к. организм не может активно выводить мочевину (нарушается работа цикла орнитин — цитруллин — аргинин).

Биологически активная добавка к пище «ПУЛДИС герпофф К» (PULDIS herpoff K).

Свидетельство о государственной регистрации: RU.77.99.88.003 R.000322.02.20 от 10.02.

В состав биологически-активной добавки к пище «ПУЛДИС герпофф К» входит L-лизин - незаменимая аминокислота, которая не может быть синтезирована организмом и поступает в организм только с пищей и добавками. «ПУЛДИС герпофф К» предназначен для восполнения дефицита аминокислоты, входящей в состав белков, ферментов, гормонов и играющей, прежде всего, важную роль в обеспечении организма энергией, как при синтезе АТФ в АТФ синтазе, так и гидролизе АТФ при трансформации энергии.

L-лизин поддерживает нормальную работу органов и является строительным материалом для белков, из которого состоят ткани и клетки нашего тела. При малом количестве лизина весь белковый обмен расстраивается. Из L-лизина возводятся белки мышц и коллагена — составляющая соединительной ткани. От него находятся в зависимости прочность и гибкость связок и сухожилий, а еще и костей, потому что он содействует усвоению кальция и его внедрению в костную ткань. Он ускоряет регенерацию костной ткани после травм и операций; предотвращает остеопороз, нарушение жирового обмена и возникновение атеросклероза; предостерегает организм от инфаркта и инсульта. Известно, стресс является одной из основных причин рецидивов герпеса разной локализации. Повышение уровня стероидных гормонов во время стресса приводит к резкому расходованию и истощению запасов аминокислот в организме, из которых строятся защитные антитела и другие важные клетки иммунной системы. Снижение уровня защитных клеток приводит к очередному, сильному рецидиву.

Механизм противогерпетического действия: Размножение вируса герпеса происходит на поверхности кожи, куда он и перемещается из нервного ганглия. Для сборки новых частиц вирусом используются части клетки. Основными строительными блоками для построения нового вируса служит аминокислота L-аргинин. L-лизин, по химической структуре и свойствам очень похож на аргинин, лизин в избыточных количествах накапливается в клетке. Вирус герпеса "ошибается" и начинает строить новые вирусы не из аргинина, а из лизина. Естественно, "новорожденные" вирусы, построенные из L-лизина тут же гибнут, размножение вируса прекращается [29-30]. Ключевой фермент в разрушении вируса - L-лизин -альфа - оксидаза. При стрессах запасы L-лизина в клетках быстро истощаются, и вирус герпеса активизируется, что приводит к рецидиву высыпания герпеса. Следует иметь в виду, что вирус герпеса увеличивает риск депрессии [31] и является причиной развития болезни Альцгеймера [32]. При своевременном приеме увеличенной дозы «ПУЛДИС герпофф К» рецидив герпеса быстро купируется. Таким образом, «ПУЛДИС герпофф К» предотвращая рецидивы герпеса, оказывает антидепрессант-подобное действие, противостоящее стрессу - основной причине рецидивов герпеса.

«ПУЛДИС герпофф К» – одно из лучших средств в борьбе с вирусом герпеса (и множества иных инфекционных болезней), которое является при этом действенным, натуральным и безвредным.

Следует отметить, что, «ПУЛДИС энергет Р» и «ПУЛДИС герпофф К» совместно восстанавливают иммунную систему и оказывают защитное действие в профилактике вирусных заболеваний, в т.ч. COVID-19. Поскольку у тяжелых пациентов с COVID-19 наблюдается эндотелиальная дисфункция и ограниченное количество NO, особенно у людей с диабетом, сердечно-сосудистыми и метаболическими заболеваниями. Эндотелиальная дисфункция вызывает усиление окислительного стресса и системного воспаления, деградиацию и выделение гликокаликса наряду с прокоагулянтным и антифибринолитическим состоянием. В таком случае, «ПУЛДИС энергет Р» может использоваться в профилактике и лечении COVID-19, также в качестве донатора NO, как включение L-аргинина в стандартную терапию больных с ишемическим инсультом, что оказывает положительное влияние на течение заболевания, ускоряет восстановление двигательных функций, способствует снижению спастического мышечного тонуса.

В то время как, данная статья готовилась к печати, была опубликована статья, где с помощью современной наноскопии сверхвысокого разрешения со стимулированным излучением живых клеток, показано, что стыки соседних крист находясь в динамике циклически непрерывно соединяются и отделяются друг от друга обратимо и сбалансированным образом в человеческих клетках. При этом, данные процессы сопровождались колебаниями мембранного потенциала в разных кристах с течением времени [33]. Замечательно, что эти экспериментальные данные полностью доказывают циклические миллисекундные набухания-сокращения внутрикристного пространства митохондрий, что является важным положением механо-хемиосмотического механизма сопряжения переноса электронов, набухания-сокращения митохондрий и синтеза АТФ.

Заключение.

Протонирование и фосфатизация остатков лизинов и аргининов в двух скрученных нитях за счет электростатического взаимодействия одноименных зарядов в электрическом поле при нейтральной величине pH приводит к выполнению работы. L-аргинин и L-лизин играют главную роль в противодействии старению и болезней, связанных со старением, а L-лизин, в том числе против остеопороза и герпеса.

Мы предлагаем научно обоснованный способ для здорового долголетия:

- выпивать суточную норму чистой воды (30 г на 1 кг веса);
- регулярно заниматься физическим трудом, делать физические упражнения;
- питаться разнообразно, регулярно, но умеренно (в зависимости от затраченной энергии);
- избегать стрессов, а в случае попадания в стрессовую ситуацию - выпить воды и заняться физическим трудом;
- обеспечить полноценный 8-и часовой сон (особенно от 23.00 до 4.00 утра) для восстановления иммунной системы;
- для обеспечения организма основными аминокислотами, принимать регулярно согласно инструкции суточную дозу ПУЛДИС энергет Р и ПУЛДИС герпофф К.

Список литературы / References:

1. Lopez-Lazaro M. The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med. Chem. journal*, 2008, vol. 8, no. 3, pp. 305-312, DOI: 10.2174/187152008783961932.
2. Giang A-H., Raymond T., Brookes P., Bentley K.M., Schwarz E., O'Keefe R., Eliseev R. Mitochondrial dysfunction and permeability transition in osteosarcoma cells showing the Warburg effect. *J Biol Chem.*, 2013, vol. 288, no. 46, pp. 33303-33311, DOI: 10.1074/jbc.M113.507129.
3. Vays V.B., Eldarov Ch.V., Vangely I.V., Kolosova N.G., Bakeeva L.E., Skulachev V.P. Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure. *Aging (Albany N.Y.)*, 2014, vol. 6, no. 2, 140-148, DOI: 10.18632/aging.100636.
4. Yu L.M., Zhang W.H., Han X.X., Li Y.Y., Lu Y. et al. Hypoxia-Induced ROS Contribute to Myoblast Pyroptosis during Obstructive Sleep Apnea via the NF- κ B/HIF-1 α Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.*, 2019, pp. 1-19, DOI: 10.1155/2019/4596368.
5. Heß V., Kasim M., Mathia S., Persson P.B., Rosenberger Ch., Föhling M. Episodic Hypoxia Promotes Defence Against Cellular Stress. *Cell Physiol Biochem.*, 2019, vol. 52, pp. 1075-1091, DOI: 10.33594/000000073.
6. Сапрунова В.Б., Солодовникова И.М., Бакеева Л.Е. Выявление цитохром с-оксидазной активности в митохондриях кардиомиоцитов изолированной ткани миокарда при длительном действии гипоксии. *Цитология*, 2008, т. 50, № 3, с. 268-274. [Saprunova V.B., Solodovnikova I.M., Bakeeva L.E. The cytochrome c oxidase activity in mitochondria of cardiomyocytes of isolated cardiac tissue under long-term hypoxic incubation. *Tsitologiya*, 2008, vol. 50, no. 3, pp. 268-274. (In Russ.)]
7. Vartapetian B.B., Andreeva I.N., Generozova I.P., Polyakova L.I., Maslova I.P., Dolgikh Y.I., Stepanova A.Y. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. *Ann Bot.*, 2003, no. 91, pp. 155-172.
8. Kasumov E.A., Zaitseva M.G., Kasumova I.V., Senakhova M.A. Effect of valinomycin on respiration, changes of medium pH, and volume in mitochondria from mung bean hypocotyls. *Russian plant physiology*, 1993, vol. 40, no. 3, pp. 375-380.

9. Vyssokikh M.Y., Holtze S., Averina O.A., Lyamzaev K.G., Panteleeva A.A., Marey M.V., Zinovkin R.A., Severin F.F., Skulachev M.V., Fasel N., Hildebrandt T.B., Skulachev V.P. Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, vol. 117, no. 12, pp. 6491-6501. DOI: 10.1073/pnas.1916414117.
10. Dröse S., Brandt U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *Jio. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 31, pp. 21649-54. DOI: 10.1074/jbc.M8032362001.
11. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. A mechano-chemiosmotic model for the coupling of electron and proton transfer to ATP synthesis in energy-transforming membranes: a personal perspective. *Photosynth Res.*, 2015, vol. 123, no. 1, pp. 1-22. DOI: 10.1007/s11120-014-0043-3.
12. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of the mechano-chemiosmotic mechanism of coupling. *J. Nov. Physiother. Phys. Rehabil.*, 2020, vol. 7, no. 1, pp. 033-035. DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/2455-5487.000075>.
13. Andrzejewski S., Gravel S-P., Pollak M., St-Pierre J. Metformin Directly Acts on Mitochondria to Alter Cellular Bioenergetics. *Cancer Metab.*, 2014, vol. 2, no. 12. DOI: 10.1186/2049-3002-2-12.
14. Dehkordi A.H., Abbaszadeh A., Mir S., Hasanvand A. Metformin and its anti-inflammatory and anti-oxidative effects; new concepts. *J. Renal. Inj. Prev.*, 2019, vol. 8, no.1, pp. 54-61. DOI: 10.15171/jrip.2019.11.
15. Kolosova, N.G., Vitovtov, A.O., Stefanova, N.A. Metformin reduces the signs of sarcopenia in old OXYS rats. *Adv. Gerontol.*, 2016, vol. 6, pp. 70-74. DOI: 10.1134/S2079057016010069.
16. Emelyanova L., Gudlawar S., Cosic M., Mirza M., Rizvi F., Holmuhamedov E., Downey F., Tajik A., Jahangir A. Metformin Inhibits Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in Human Cardiac Mitochondria. *Circulation Research*, 2014, vol. 115, p. A322.
17. Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. On the MechanoChemiosmotic Mechanism of Action of Guanidines on Functional Activity of Mitochondria and Aging. *Organic Chem. Curr. Res.*, 2015, vol. 4, pp. 1-7. DOI: 10.4172/2161-0401.1000136.
18. Касумов Э.А., Касумов Р.Э., Касумова И.В. Механизм трансформации энергии согласно механо-хемиосмотической модели. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019: материалы XIV международной научной конференции, 21-24 ноября г. Москва, 2019, с. 94.* [Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V. Mechanism of energy transformation according to the mechano-chemiosmotic model. *Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2019: proceedings of XIV International Scientific Conference, Moscow, 2019, p. 94.*]
19. Singh N.B., Shiva Saran Das, Singh A.K. Physical Chemistry: Volume II. *New Age International Pvt Ltd Publishers*, 2009, 579 p.
20. Kodera, N., Ando, T. The path to visualization of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Biophys. Rev.*, 2014, vol. 6, no. 3-4, pp. 237-260.
21. Tominaga Y., Shimmen T., Tazawa M. Control of cytoplasmic streaming by extracellular Ca²⁺ in permeabilized Nitella cells. *Protoplasma*, 1983, vol. 116, pp. 75-77.
22. Жерелова О.М., Катаев А.А., Грищенко В.М., Штанчаев Р.Ш. Галоперидол-модулятор ионного транспорта клеток Chara Corallina. *Цитология*, 2016, т. 58, № 8, с. 646-654. [Zherelova O.M., Kataev A.A., Grischenko V.M., Shtanchaev R.S. Haloperidol modulates ionic transport of chara coralline cells. *Tsitologia*, 2016, vol. 58, no. 8, pp. 646-654. (In Russ.)]
23. Bridges H.R., Jones A.J., Pollak M.N., Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J.*, 2014, vol. 462, no. 3, pp. 475-487. DOI: 10.1042/BJ20140620.
24. Papa S., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A. On the mechanism of action of alkyl-guanidines on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Eur J Biochem.*, 1975, vol. 55, no. 1, pp. 1-8.
25. Heffernan K.S., Fahs C.A., Ranadive S.M., Patvardhan E.A. L-arginine as a nutritional prophylaxis against vascular endothelial dysfunction with aging. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.*, 2010, vol. 15, no. 1, pp. 17-23. DOI: 10.1177/1074248409354599.
26. Mitchell T.R., Glenfield K., Jeyanthan K., Zhu X.D. Arginine methylation regulates telomere length and stability. *Mol Cell Biol.*, 2009, vol. 29, no. 18, pp. 4918-4934. DOI: 10.1128/MCB.00009-09P.
27. Böger R.H., Bode-Böger S.M., The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, vol. 41, pp. 79-99. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.79.
28. Wu G., Morris S.M., Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 1998, vol. 336, pp. 1-17. DOI: 10.1042/bj3360001.
29. Mailoo VJ, Rampes S. Lysine for Herpes Simplex Prophylaxis: A Review of the Evidence. *Integr. Med. (Encinitas)*, 2017, vol. 16, no.3, pp. 42-46.

30. Griffith R.S., Walsh D.E., Myrmel K.H., Thompson R.W., Behforooz A. Success of L-lysine Therapy in Frequently Recurrent Herpes Simplex Infection. Treatment and Prophylaxis. *Dermatologica*, 1987, vol. 175, no. 4, pp. 183-90.
31. Kobayashi N., Oka N., Mayumi M., Shimada K., Ishii A., Tatebayashi Y., Shigeta M., Yanagisawa H., Kondo K. Human Herpesvirus 6B Greatly Increases Risk of Depression by Activating Hypothalamic-Pituitary - Adrenal Axis during Latent Phase of Infection. *iScience*, 2020, vol. 23, no. 6. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101187.
32. Itzhaki R.F. Corroboration of a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2018, vol. 10, no. 324. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00324.
33. Kondadi A.K., Anand R., Hansch S., Urbach J., Zobel T., Wolf D.M., Segawa M., Liesa M., Shirihai O.S., Weidtkamp-Peters S., Reichert A.S. Cristae undergo continuous cycles of membrane remodelling in a MICOS-dependent manner. *EMBO Rep.*, 2020, vol. 21, p. e49776. DOI: 10.15252/embr.201949776.

THE MECHANISM OF ACTION OF PREPARATIONS OF PULDIS energet R AND PULDIS herpoff K ON ENERGY AND THEIR ROLE IN THE PREVENTION OF AGING AND AGE-RELATED DISEASES

Kasumov E.A., Kasumov R.E., Kasumova I.V.

Research and Production Center «KORVET»

Kryukovo village, 30, Domodedovo, Russia; e-mail: kasumov_eldar@mail.ru

Abstract. Despite the efforts of scientists, the problems of premature aging, as well as diseases such as cancer, diabetes, herpes zoster, osteoporosis, and others still remain unresolved. Guanidine compounds have a strong effect on these processes. According to the mechano-chemiosmotic mechanism we have developed, energy transformation both in the synthesis and in the hydrolysis of ATP occurs with the direct participation of amino acid residues of arginine (a physiological compound of guanidine) and lysine. In addition, arginine and lysine are involved in many processes in the cell metabolism. Since arginine in the body is synthesized up to 28-30 years, we believe that aging begins with a decrease in arginine synthesis. After this age, it is necessary to maintain the arginine content in the organism by taking it exogenously, and the lysine content of an essential amino acid must be constantly replenished. For this purpose, we have developed and registered biologically active additives - the PULDIS energet R and PULDIS herpoff K preparations, containing L-arginine and L-lysine, respectively. In this regard, we offer a recipe for healthy longevity.

Key words: mechano-chemiosmotic mechanism, aging, disease, arginine, lysine.

NUTRITION ADDITIVE OF E322 AS PHOSPHATIDYLCHOLINE SOURCE FOR ENVELOPE IN NANOSCALE FORMULATION

Pogorelov A.G.¹, Stepanova T.A.¹, Pogorelova V.N.¹, Suvorov O.A.¹, Gulin A.A.²

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS

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

² N.N. Semenov` Institute of Chemical Physics RAS

ul. Kosygina 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: aleksandr.gulin@phystech.edu

Received: 06.07.2020

Abstract. Microporous nanomaterials can provide interesting tools for different goals from bioimaging to the delivery of bioactive molecules. In this study, the procedure based on cryoapproaches was designed to formulate the nanoparticles of clinoptilolite from Zeolites mineral family. Applying scanning electron microscopy, clinoptilolite particles were imaged. Retting the nanoparticles in the ethanol solution of phosphatidylcholine (lecithin), the particle was encapsulated in lecitin envelope. Registering the diminution of optical density (OD 235) for ethanol/lecitin solution, the sorption of lecitin by clinoptilolite nanoparticles was studied with UV spectrometry. The kinetics of lecitin/clinoptilolite complex development was shown to exhibit intricate behavior, when the adsorption of lecitin was followed with its gradual desorption resulting in the increase of lecitin content in ethanol solution back toward the original level. The distribution of final size for lecitin/clinoptilolite complex was determined with dynamic light scattering technique. To our knowledge, there are no reports of natural zeolite nanoparticles that were used as the platform for nanosize capsule with phospholipids shell.

Key words: *phosphatidylcholine (lecithin), UV spectrometry, scanning electron microscopy, nanocapsule.*

The most natural way of introducing biologically active molecules into the body is through the gastrointestinal tract. This approach is especially effective if it is necessary to directly deliver substances to the gastrointestinal epithelium [1]. This situation occurs during the treatment of a number of complications due to gastrointestinal upset. However, the effect of the drug can be significantly reduced by enzymes (peptidases, proteases, amylases, lipases, nucleases) and acidity (pH ~ 2–8). In order to maintain specific activity in an aggressive environment of the stomach and intestinal lumen, the introduced substances are converted into a colloid or suspension of nanoparticles [2–6].

Inorganic substances are considered as promising materials for creating the micro and nanocontainers [7–9]. Zeolite is one of the most abundant natural mineral, widely distributed throughout the world and used in food production and agricultural technologies [10–13]. The microporous structure significantly increases the surface area of zeolite particles available for adsorption. Among the naturally occurring Zeolites family, clinoptilolite is the most widespread and studied for biomedical purposes as the antioxidant [14] and anti-inflammatory agents [15], and excellent detoxifying [16]. A method has been developed to obtain synthetic zeolite nanoparticles in laboratory conditions [17–22]. Even though there are several synthetic species of zeolites, their production is limited by small volumes, the cost of final products and the need to purify it from the ingredients involved in the synthesis. An alternative to synthetic nanoparticles may be natural zeolite, which is mined on an industrial scale [12, 23].

In the case of mucous epithelium, the affinity for the nanoparticle is with the mucous layer, which contributes to its adhesion on the surface of the layer and further diffusion to the apical membrane of enteric cells. The coating of particle with shell allows the biocompatibility of water-insoluble [24–26] or solid materials [27, 28]. For this purpose, the surface of nanoparticles can be modified with phospholipids [29, 30] the main components of cellular membranes. The phospholipids shell also provides prolonged release of the active substance and protects it from the aggressive environment of gastrointestinal tract. Therefore, a structure of zeolite (core) and phospholipid (shell) is considered a promising composition for producing a nanopatform.

An example of the successful use of aluminosilicate for the transport of biomolecules is a study in which a synthetic zeolite-L nanocrystal was employed as a container for the delivery of nucleic acids and organic molecules [24]. In this work, a poly-L-lysine coating allows the transport of the nanoparticle into the HeLa cell to be more efficient. To our knowledge, there are no reports of natural zeolite nanoparticles with phospholipids shell. In addition, there is no data on how a phospholipid will behave when interacting with negatively charged clinoptilolite nanoparticles. Thus, the aim of this work was to: (1) develop a method for producing nanoscale particles of natural clinoptilolite, (2) study the sorption of phosphatidylcholine by the particles obtained.

MATERIALS AND METHODS

Pretreatment of clinoptilolite. We used the commercial product Litovit M (Russia), which was manufactured from a natural zeolite originated from Kholinsky deposit, Russia. Cascade mechanical activation allowed the industrial method to purify natural zeolite from impurities and to obtain the powder of 100% content for active component - clinoptilolite. The microsize particles were achieved after clinoptilolite powder is triturated in a porcelain mortar at room temperature.

Scanning electron microscopy. The investigated samples were visualized by scanning electron microscopy. The suspension of clinoptilolite particles in distilled water (30 mg/100 ml) was pre-treated with ultrasound for 20 seconds.

The suspension droplet of $\sim 2 \mu\text{l}$ was placed on the surface of the sample holder for the electron microscope. After the water was evaporated at room temperature in the stream of clean air, the specimen was coated with approximately 10 nm thick platinum layer in a JFC-1600 (JEOL, Japan) unit. A Pt film significantly enhances the signal of secondary electrons, removes the electrostatic charge and protects the sample from heating, which causes its mechanical destruction. The fine structure of the object's relief was studied in a scanning electron microscope JSM-6390A (JEOL, Japan), at an accelerating voltage of 25 kV in the secondary electron mode.

Extraction of phosphatidylcholine. Phosphatidylcholine was extracted from nutrition additive of E322 (Cargill Lecigran 1000P, Germany), which is a mixture of polar phospholipids. A portion of 600 mg was thoroughly mixed in 6 ml of 100% Ethyl Alcohol (ETON) until a homogeneous suspension. The extraction of ETON soluble phosphatidylcholine (lecithin) was carried out at room temperature for 24 hours. The undissolved component was separated by centrifugation at 600g for 10 minutes. The uterine extract obtained in this way was taken into a clean glass sealed tube, which was stored at 4°C in the dark. For the experiments, a working solution was used, which was obtained by diluting the mother liquor 30 times with ethanol.

Application of phosphatidylcholine to the particle surface. A portion of 20 mg of clinoptilolite particles was incubated at room temperature for a different time interval (1 / 4h, 1 / 2h, 1h, 1.5h, 2h, 3h, 4h, 6h) in 4 ml of a working solution of lecithin stirring with horizontal shaking. The resulting suspension was centrifuged at 600 g for 10 minutes. Then, 3 ml of supernatant was taken into a quartz cuvette. The lecithin solution sample thus obtained was investigated by UV spectrometry.

UV spectrometry. In the ultraviolet region of the absorption spectrum of phosphatidylcholine, three maxima are recorded: 200-210 nm, 235 nm and 280 nm. For measurements, we used the absorption peak of carbonyl groups at a wavelength of 235 nm. The choice was due to the instability of the signal at a wavelength of 200-210 nm, as well as a relatively low peak level at 280 nm. The optical density of the initial working solution of lecithin at a characteristic wavelength (235 nm) is 0.76 units, which corresponds to optimal conditions for analytical measurements on a Specord M40 spectrophotometer (Carl Zeiss, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Obtaining nanoscale particles of natural clinoptilolite. After grinding in a planetary mill and a porcelain mortar, clinoptilolite powder was ground at -35°C in an agate mortar. The powder obtained at low temperature was transferred

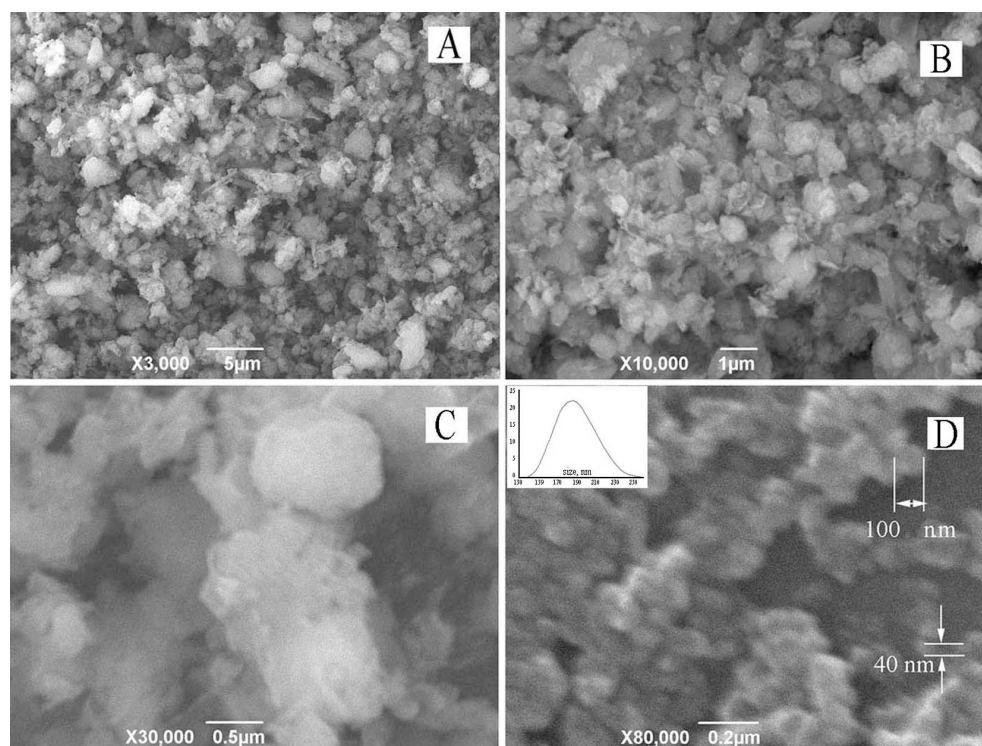


Figure 1. Microphotographs of clinoptilolite particles: (A) the original sample of “Litovit M”; (B) the powder after grinding “Litovit M” in a planetary ball mill; (C) the powder obtained after grinding the powder in a porcelain mortar at room temperature; (D) nanosize particles obtained after additional grinding of powder in an agate mortar at a low temperature of -35°C followed by low-temperature dehydration in vacuum. Insertion: the size distribution of nanoscale particles of clinoptilolite with a lecithin shell

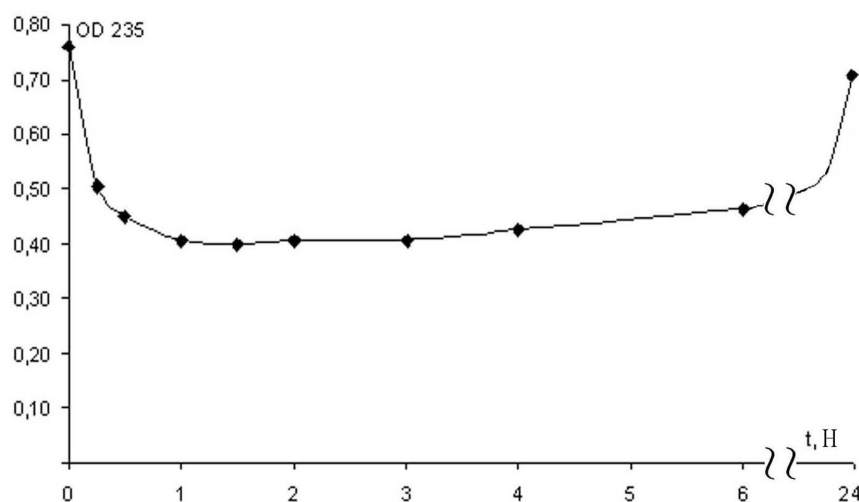


Figure 2. The change in optical density (OD 235) at a wavelength of 235 nm in the absorption spectrum of the working solution of alcohol-soluble lecithin depending on the incubation time of clinoptilolite nanoparticles in it

in vapor of liquid nitrogen to a vacuum chamber, where the sample was heated to room temperature. This technique eliminates the condensation of water vapor from the atmosphere to the surface of a cold sample, which causes aggregation of particles. The obtained clinoptilolite sample was visualized by scanning electron microscopy. Figure 1 shows the set of microphotographs demonstrating changes in the size of clinoptilolite particles at different stages of the proposed technology.

It is seen that after the planetary mill from the initial preparation (Fig. 1A) we obtain micron-sized particles (Fig. 1B). As a result of subsequent grinding of the sample in a porcelain mortar at room temperature, spherical submicron clusters are formed (Fig. 1C). After the final stage of low-temperature processing, nanosized particles were obtained (Fig. 1D), the magnitude of which varies. The inset in the figure shows a histogram of the size distribution of the clinoptilolite / lecithin complex in the range of 140 nm - 260 nm and a maximum in the region of 190 nm. Data obtained by dynamic light scattering.

Clinoptilolite/lecithin complex. Sorption of the obtained zeolite particles of lecithin from the working solution was carried out in accordance with the described procedure. The presence of an effect was determined by a decrease in the content of phosphatidylcholine, measuring the optical density of the solution at a wavelength of 235 nm (OD 235). Figure 2 shows the value of this parameter at different time intervals for the incubation of nanoparticles.

It is seen (Fig. 2) that the kinetics of sorption of phosphatidylcholine is complex. A decrease in optical density means a decrease in the concentration of lecithin in solution as a result of the formation of a clinoptilolite / lecithin complex. This process is realized through adsorption, since the size (~0.2 nm) of the pores of the zeolite does not allow phospholipid molecules to penetrate into the particles. Thus, a nanoscale platform is formed with a clinoptilolite core and a layer of lecithin on the surface.

Within two hours, the lecithin content in the solution reaches a minimum value (~0.4 OD), but the adsorption process is reversible. Over time, the optical density of the solution is restored to the initial level (Fig. 2), which means the presence of desorption of phosphatidylcholine. This experimental fact allows us to apply the method of direct identification of the presence of clinoptilolite / lecithin complex. For this purpose, the precipitate, which was obtained by incubating 20 mg of zeolite particles in 4 ml of a working solution of lecithin, was transferred to 15 ml of distilled water to remove unbound phosphatidylcholine. After centrifugation (600 g) of the suspension, water was carefully taken and 3 ml of ethanol was added to the precipitate. Further desorption of lecithin was carried out for 24 hours at room temperature in the dark. The effect was evaluated by increasing the optical density (OD 235nm) of the alcohol solution (Fig. 3).

The diagram (Fig. 3) shows that relative to the beginning of the experiment (Fig. 3-1), as a result of phospholipid adsorption on clinoptilolite particles, the concentration of lecithin in the working solution decreases (Fig. 3-2). After adding ethanol to the sediment of the clinoptilolite/lecithin complex (Fig. 3-3), desorption of phosphatidylcholine is observed. As a result, an increase in the optical density of the solution is recorded (Fig. 3-4), which indicates the presence of a lecithin shell in the zeolite particle. The combination of nanoscale and phospholipid coating is a prerequisite for the successful diffusion of particles through the barrier layer of mucus of the enteric epithelium [31, 32]. We met these criteria when creating a nanopatform from a natural clinoptilolite with a lecithin shell. The possibility of transferring biomolecules by a zeolite nanoparticle is shown by the example of nucleic acids [24]. However, one should take into account not only the carrier properties of the zeolite nanoparticles, but other possible uses including excellent detoxifying [16] and as the antioxidant [14] or anti-inflammatory agents [15].

The data obtained allow us to make the following conclusions. This work describes a very first example of the use of nanoparticles from zeolite of natural origin as cores to create the capsule with phospholipide shell. Clinoptilolite nanoscale particles were successfully produced using ordinary laboratory equipments and the commercial product containing clinoptilolite (100%). The mode size of ~100 nm was achieved after its grinding at low temperature of -35°C

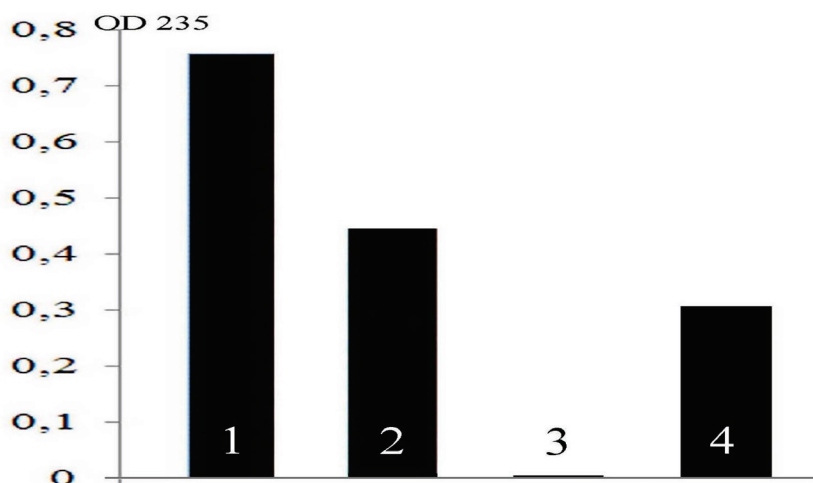


Figure 3. Changes of optical density (OD 235) at a wavelength of 235 nm in the absorption spectrum of lecitin/ethanol solution: (1) the solution of lecithin in ethanol, (2) after incubation (2 hours) of clinoptilolite nanoparticles in lecitin/ethanol solution, (3) ethanol, (4) after incubation (24 hours) of clinoptilolite/lecitin complex in ethanol

followed with freeze-drying. These results are very promising from the point of view of micro- and nanogrinding of tailored products. Using a solution of phosphatidylcholine in ethanol, a method for creating a nanoplatfrom based on a clinoptilolite core with a phospholipid shell has been developed. It was shown that the formation of lecitin/c clinoptilolite complex has complex kinetics when the adsorption of lecithin with its subsequent desorption into a ethanol is recorded in the initial phase.

This work was supported by the Russian Science Foundation grant № 20-16-00019.

References:

1. Simonoska-Crcarevska M., Glavas-Dodov M., Goracinova K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, vol. 68, pp. 565-578.
2. Render D., Samuel T., King H., Vig M., Jeelani S., Babu R.J., Rangari V. Biomaterial-Derived Calcium Carbonate Nanoparticles for Enteric Drug Delivery. *J. Nanomaterials*, 2016, vol. 2016, pp. 1-8.
3. Allemann E., Leroux J.-C., Gurny R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Advanced Drug Delivery Rev.*, 1998, vol. 34, pp. 171-189.
4. Hu Y., Jiang X., Ding Y., Ge H., Yuan Y., Yang C. Synthesis and characterization of chitosan–poly (acrylic acid) Nanoparticles. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 3193-3201.
5. Jintapattanakit A., Junyaprasert V.B., Maob S., Sitterberg J., Bakowsky U., Kissel T. Peroral delivery of insulin using chitosan derivatives: A comparative study of polyelectrolyte nanocomplexes and nanoparticles. *Int. J. Pharmaceutics*, 2007, vol. 342, pp. 240-249.
6. Zhu J., Hayward R.C. Hierarchically Structured Microparticles Formed by Interfacial Instabilities of Emulsion Droplets Containing Amphiphilic Block Copolymers. *Angew Chem. Int. Ed.*, 2008, vol. 47, pp. 2113-2116.
7. Yu X., Khalil A., Dang P.N., Alsberg E., Murphy W.L. Multilayered Inorganic Microparticles for Tunable Dual Growth Factor Delivery. *Adv. Funct. Mater.*, 2014, vol. 24, pp. 3082-3093.
8. Kar S. An Overview of Recent Advances in Application of Some Inorganic Materials-Biological and Technological Perspectives *J. Biotechnol. Biomater.*, 2016, vol. 6, pp. 565-578.
9. Stefanache A., Ignat M., Peptu C.A., Diaconu A., Stoleriu I., Ochiuz L. Development of a Prolonged-Release Drug Delivery System with Magnolol Loaded in Amino-Functionalized Mesoporous Silica *Appl. Sci.*, 2017, vol. 7, pp. 237-250.
10. Kojića D., Pajevića S., Jovanović-Galovića A., Puraća, J.E., Škondrićb S., Milovaca S., Popovića Ž., Grubor-Lajšić G. Efficacy of natural aluminosilicates in moderating drought effects on the morphological and physiological parameters of maize plants (*Zea mays* l.). *J. Soil Sci. and Plant Nutrition*, 2012, vol. 12, pp. 113-123.
11. Yada R.Y., Buck N., Canady R., DeMerlis C., Duncan T., Janer G., Juneja L., Lin M., McClements D.J., Noonan G., Oxley J., Sabliov Cr., Tsytsikova L., Vázquez-Campos S., Yourick J., Zhong Q., Thurmond S. Engineered Nanoscale Food Ingredients: Evaluation of Current Knowledge on Material Characteristics Relevant to Uptake from the Gastrointestinal Tract. *Food Science and Food Safety*, 2014, vol. 13, pp. 730-744.
12. Bohacs K., Fajtli J., Bokanyi L., Mucsi G. Control of Natural Zeolite Properties by Mechanical Activation in Stirred Media Mill. *Arch. Metall. Mater.*, 2017, vol. 62, (2B), pp. 1399-1406.
13. Hazra D.K. Nano-formulations: High Definition Liquid Engineering of Pesticides for Advanced Crop Protection in Agriculture. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2017, vol. 6, pp. 00211-00212.
14. Pellegrino P., Mallet B., Delliaux S., Jammes Y., Guieu R., Schaf O. Zeolites are effective ROS-scavengers in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, vol. 410, pp. 478-483.

15. Bacakova L., Vandrovcova M., Kopova I., Jirka I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomater. Sci.*, 2018, vol. 6, pp. 974-989.
16. Selim M.M., El-Mekkawi D.M., Aboelenin R.M.M., Sohair A.S.A., Ghada M.M. Preparation and characterization of Na-A zeolite from aluminum scrub and commercial sodium silicate for the removal of Cd²⁺ from water. *J. Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 2017, vol. 24, pp. 19-25.
17. Johnson E.B.G., Arshad S.E. Hydrothermally synthesized zeolites based on kaolinite: A review. *Appl. Clay Sci.*, 2014, vol. 98, pp. 215-221.
18. Severance M.A. *Nanocrystalline Zeolites: Synthesis, Mechanism, and Applications*. Dissertation for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of The Ohio State University, 2014.
19. Tian Y. *Synthesis and Characterization of Crystalline Microporous Materials: Investigation of New Synthetic Routes*. A Thesis for the Degree of PhD at the University of St Andrews, 2014.
20. Mintova S., Grand J., Valtchev V. Nanosized zeolites: Quo Vadis? *C. R. Chimie*, 2016, vol. 19, pp. 183-191.
21. Tiburu E.K., Salifu A., Aidoo E.O., Fleischer H.N.A., Manu G., Yaya A., Zhou H., Efavi J.K. Formation of Chitosan Nanoparticles Using Deacetylated Chitin Isolated from Freshwater Algae and Locally Synthesized Zeolite A and their Influence on Cancer Cell Growth. *J. Nano Research*, 2016, vol. 48, pp. 156-170.
22. Tosheva L., Belkhair S., Gackowski M., Malic S., Al-Shanti N., Verran J. Rapid screening of the antimicrobial efficacy of Ag zeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, vol. 157, pp. 254-260.
23. Elhassan A.M. Determination of the Natural Zeolites Characteristics in Sudan Country. *Int. J. Current Advanced Res.*, 2016, vol. 5, pp. 1304-1310.
24. Bertucci A., Lülfi H., Septiadi D., Manicardi A., Corradini R., De Cola L. Intracellular Delivery of Peptide Nucleic Acid and Organic Molecules Using Zeolite-L Nanocrystals. *Adv. Healthcare Mater.*, 2014, vol. 3, pp. 1812-1817.
25. Li Le-Le, Zhang R., Yin L., Zheng K., Qin W., Selvin P.R., Lu Y. Biomimetic Surface Engineering of Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles as Versatile Bioprobes. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2012, vol. 51, pp. 6121-6125.
26. Euliss L.E., DuPont J.A., Gratton S., DeSimone J. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.*, 2006, vol. 35, pp. 1095-1104.
27. Grenha A., Remunan-Lopez C., Carvalho E.L.S., Seijo B. Microspheres containing lipid/chitosan nanoparticles complexes for pulmonary delivery of therapeutic proteins. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, vol. 69, pp. 83-93.
28. Shchukina E.M., Shchukin D.G. Layer-by-layer coated emulsion microparticles as storage and delivery tool. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2012, vol. 17, pp. 281-289.
29. Fricker G., Kromp T., Wendel A., Blume A., Zirkel J., Rebmann H., Setzer C., Quinkert R., Martin F., Müller-Goyman C. Phospholipids and Lipid-Based Formulations in Oral Drug Delivery. *Pharm. Res.*, 2010, vol. 27, pp. 1469-1486.
30. Baldassarre F., Allegretti C., Tessaro D., Carata E., Citti C., Vergaro V., Nobile C., Cannazza G., D'Arrigo P., Mele A., Dini L., Ciccarella G. Biocatalytic Synthesis of Phospholipids and Their Application as Coating Agents for CaCO₃ Nano-crystals: Characterization and Intracellular Localization Analysis. *ChemistrySelect*, 2016, vol. 1, pp. 6507-6514.
31. Ensign L.M., Cone R., Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, vol. 64, pp. 557-570.
32. Kotta S., Wadood Khan A., Pramod K., Ansari S.H., Sharma R.K., Ali J. Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2012, vol. 9, pp. 585-598.

МОДИФИКАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРНОЙ СРЕДЫ КОМПОНЕНТАМИ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Смоленцева Д.А.¹, Миронова А.Г.², Сыбачин А.В.¹, Афанасьева С.И.¹, Симоненко Е.Ю.¹

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

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

Поступила в редакцию: 07.07.2020

Аннотация. Криоконсервация – современный удобный метод хранения биологического материала. Однако криоконсервация может приводить и к нежелательным явлениям, вызванным повреждением биологического материала. Для защиты клеток от повреждения используют криопротекторные среды, включающие проникающие в клетку компоненты (глицерин, ДМСО) и непроникающие (дисахара, белки). К непроникающим компонентам относится яичный желток. Ранее в наших работах было показано, что модификация криопротектантов суспензией яичного желтка – один из наиболее эффективных методов улучшения выживаемости сперматозоидов. В связи со сложностью использования соединений животного происхождения для клеток человека, в работе представлено исследование модификации базового (коммерческого) криопротектора SpermFreeze компонентами желтка: лецитином и холестерином. Проведены тесты на цитотоксичность для различных растворителей холестерина, подобраны концентрации всех компонент, определены изменения индекса подвижности сперматозоидов после заморозки-разморозки во всех исследуемых модификациях криопротекторной среды. В работе проведено сравнение методов измерения концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов для выбора оптимального протокола. Также в работе показано, что модификация базового криопротектора комплексами циклодекстрин-холестерин повышает выживаемость сперматозоидов на 13% и так же эффективно, как с добавлением суспензии яичного желтка; добавление лецитина значительно повышает эффективность базового криопротектора.

Ключевые слова: криопротектор, яичный желток, лецитин, холестерин, подвижность сперматозоидов, BPT

В современной медицине и биологии всё более широкое применение находят методы работы с клетками, связанные с низкими температурами, такие как криохирургия, криофиксация, криоконсервация. Метод криоконсервации активно используется для сохранения плазмы крови, пуповинной крови, стволовых клеток [1,2]. Так, криобанки спермы, яйцеклеток, предимплантационных эмбрионов, яичниковой ткани являются неотъемлемой частью вспомогательных репродуктивных технологий. Однако криоконсервация также приводит и к нежелательным явлениям, вызванным повреждением биологического материала. Подвижность и оплодотворяющая способность сперматозоидов после криоконсервации уменьшается в среднем на 30-70%, еще сложнее сохранить одиночные клетки. [1]. Такая широкая изменчивость выживаемости определяется функцией плазматических мембран: их пластичностью, состоянием ферментных систем, способностью выдерживать деформационные напряжения, возникающие при фазовых переходах лед-вода. Для защиты клеток при криоконсервации используют специальные вещества – криопротекторы: проникающие (глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид (ДМСО), пропиленгликоль) и непроникающие (сахароза, трегалоза, высокомолекулярные соединения, белки, поливинил спирт и др.). Для снижения цитотоксичности криопротекторные среды, как правило, представляют собой комбинацию проникающих и непроникающих компонент. Известно, что глицерин, наносит наименьшее повреждение клеткам, в сравнении с другими соединениями [2]. Поэтому многие коммерческие среды для заморозки биологического материала разработаны на основе глицерина. Добавление яичного желтка в культуру клеток снижает интенсивность осмотических процессов за счет создания на поверхности клеток гидрофобной фазы из липоидных компонентов [3]. Ранее в наших работах был разработан протокол эффективной модификации базовой криопротекторной среды эмульсией желтка (в концентрации 5,6 мг/мл). Нами было показано, что присутствие эмульсии желтка в криопротекторе увеличивает долю жизнеспособных клеток на 10-12% и снижает дефекты плазматических мембран после криоконсервации на 5-15% по сравнению с коммерчески доступными аналогами [4, 5]. Однако применение желтка, имеющего животное происхождение, для криоконсервации клеток человека в клинической практике затруднено. Поскольку механизмы криопротекторного действия яичного желтка связаны с влиянием фосфатидилхолина и холестерина на параметры плазматических мембран, нами была проведена оценка минимальной концентрации холестерина во внешней среде необходимой для равновесного состояния содержания холестерина в плазматической мембране ($3,3 \cdot 10^{-2}$ нмоль/мл) [4]. Концентрация холестерина в разработанном нами протоколе модификации криопротектора эмульсией желтка составляла 224 нмоль/мл. Известно, что встраивание холестерина в клеточные мембраны обеспечивает их стабильность и достаточно высокую подвижность в широком диапазоне температур 5-70°C, приводит к стабилизации гексагональной фазы

(Нп). [6, 7]. Увеличение концентрации холестерина в жидкокристаллической структуре мембраны приводит к увеличению пластичности мембран во время фазовых переходов, что определяет их устойчивость к повреждениям при деформациях во время криоконсервации. Так, была обнаружена строгая корреляция молярного процента холестерина с криотолерантностью сперматозоидов разных видов млекопитающих [8]. В связи с этим, интересен вопрос об эффективности модификации криопротекторных сред компонентами яичного желтка – холестерином и фосфатидилхолином, а также способах их разведения.

В настоящей работе были предложены и исследованы различные протоколы модификации базовой криопротекторной среды холестерином, фосфатидилхолином (лецитином); проведены тесты на цитотоксичность и определена доля клеток с активными формами подвижности после криоконсервации для всех исследуемых сред.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельного объекта для исследования был выбран сперматозоид человека, поскольку для данных клеток разработаны четкие критерии оценки степени их выживаемости после разморозки. В работе было использовано более 15 эякулятов доноров, соответствующих критериям нормозооспермии (минимальные критерии основных показателей оценки сперматозоидов в пределах нормальных значений) [9]. Оценка доли выживших клеток проводилась по определению их индекса подвижности. Критерии подвижности, определенные в камере Маклера: категория а – прямолинейное быстрое движение, b – прямолинейное медленное движение, с – непрямолинейное движение, d – неподвижные сперматозоиды. К нормальным формам подвижности относят клетки с категориями а и b. Индекс подвижности рассчитывался по следующей формуле:

$$I = P_{\text{после}} / P_{\text{до}} * 100\%,$$

где $P_{\text{до}}$ и $P_{\text{после}}$ кол-во клеток с нормальными формами подвижности а+b до и после криоконсервации).

Для проверки соединения на цитотоксичность клетки инкубируются с исследуемым раствором в течении 90 минут, затем их показатели сравниваются с контрольным образцом. Если значение индекса подвижности после эксперимента больше 80%, то раствор считается не цитотоксичным. Клетки замораживались методом медленной заморозки (медленное поэтапное перемещение образцов в сосуде Дьюара, позволяющее всей системе приходить в состояние равновесия на каждом этапе). В работе были также использованы материалы: холестерин (Sigma), промышленный криопротектор на основе глицерина SpermFreeze (SpF) (LifeGlobal), среда для культивации сперматозоидов AllGradWash (LifeGlobal), гидроксипропил-бета-циклодекстрины (Hp-β-dx) (Sigma), растворы н-октана, декана, додекана, лиофилизованная пудра соевого лецитина (фосфатидилхолин) (Sigma). Для определения концентрации холестерина в мембране сравнивались следующие методы: ферментативный анализ, ИК-спектроскопия и метод Либермана-Бурхарда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были рассмотрены 3 метода по определению концентрации холестерина в мембранах сперматозоидов: ферментативный метод, модифицированный метод Абея-Кендалла (Либермана-Бурхарда) и инфракрасная спектроскопия. Для каждого метода был разработан отдельный протокол специально для сперматозоидов человека. Сложность ферментативного метода заключается в том, что фермент холестериноксидаза активен лишь в отношении свободного холестерина, поэтому эфирсвязанный холестерин должен быть предварительно гидролизован при помощи фермента холестеринэстеразы. В свою очередь, для доступности холестерина этому ферменту, необходимо экстрагировать его из мембраны, что делалось при помощи детергента Triton X-100 (в течение 1 часа). Содержание холестерина измерялось по величине поглощения раствором света с длиной волны 513нм. Преимуществом метода инфракрасной спектроскопии заключается в том, что он не требует экстракции холестерина из мембран клеток (как правило именно эта часть самая токсичная и сложная). В ходе выполнения исследования вначале были построены ИК-спектры холестерина разной концентрации, затем по пику в спектре холестерина на волновом числе $\nu=2940 \text{ см}^{-1}$ была построена калибровочная прямая, по которой определялась масса холестерина в высушенном образце клеток. Метод Либермана-Бурхарда можно назвать эталонным для количественного определения холестерина, при помощи которого можно определить наномолярные концентрации вещества. Основной недостаток данного метода - его высокая токсичность: в состав необходимых соединений входят такие, как серная кислота, уксусный ангидрид, а также хлороформ и метанол для экстракции липидов. Так, экстракция холестерина из мембраны проводилась методом Фолча, для которого характерно использование достаточно больших объемов хлороформа и метанола и длительное время экспозиции. Содержание холестерина измерялось по величине поглощения света с длиной волны 650нм. Для построения калибровочной прямой были обработаны растворы с известными концентрациями холестерина от 0 до 200нмоль/мл. Все полученные в этой части работы результаты можно представить в виде таблицы 1.

Таблица 1. Концентрации холестерина, полученные тремя разными методами и сравнение их с литературными источниками [8]

Ферментативный анализ	ИК-спектроскопия	Абея-Кендалла	Литературные данные
$C_{\phi} = 0,48 \pm 0,03$ нмоль/млн	$C_{\text{ИК}} \sim 5$ нмоль/млн	$C_{\text{АК}} = 1,53 \pm 0,15$ нмоль/млн	$C_{\text{лит}} = 1,2 \pm 0,3$ нмоль/млн

Из данной таблицы можно увидеть, что результат, полученный методом Абея-Кендалла, лучше всего соотносится с литературными данными [5]. Значит, в дальнейшем, для точного определения концентраций холестерина нужно использовать именно его. Но другие методы имеют ряд значительных преимуществ перед методом Абея-Кендалла (в первую очередь, это малая токсичность), поэтому необходимо модифицировать их протоколы в соответствии с указанными ранее предположениями.

Подбор концентраций и протоколы модификации криопротектора эмульсией яичного желтка и лецитином были нами разработаны ранее [4, 5]. Поэтому во второй части данной работы были проведены эксперименты по определению метода модификации базового криопротектора SpF холестерином. Основная проблема заключается в поиске оптимального растворителя для холестерина, с помощью которого он мог бы быть доставлен к суспензии клеток. Были предложены такие неполярные растворители как н-октан, декан и до-декан. Конечная концентрация холестерина составляла 100 нмоль/мл при концентрации клеток – 100 миллионов на миллилитр. Основное требование к растворам – их нетоксичность для сперматозоидов, поэтому конечная концентрация растворителя после добавления к криопротектору SpF составляла 10 мкл/мл. Результаты теста на цитотоксичность представлены в Таблице 2. Видно, что н-октан обладает наименьшей токсичностью для клеток, поэтому он был выбран в качестве растворителя холестерина и был использован в дальнейших экспериментах по модификации криопротектора.

Были использованы разные методики добавления раствора холестерина к клеткам и различные концентрации холестерина в итоговом растворе: добавление раствора холестерина к клеткам до смешивания с криопротектором; добавление непосредственно в криопротекторную среду; концентрации холестерина 100 нмоль/мл и 200 нмоль/мл. Однако ни один из способов модификации криопротектора раствором холестерина в н-октане не повысил выживаемость клеток после заморозки – разморозки. Из рисунка 1 видно, что статистически значимых отличий в индексе подвижности для образцов, замороженных с разными средами, нет.

Таблица 2. Тест на цитотоксичность. Сравнение доли живых клеток с положительными формами подвижности в присутствии различных неполярных растворителей и в присутствии эмульсии желтка (5,6 мг/мл)

Время инкубации	Нативный образец	Холестерин в декане	Холестерин в н-октане	Холестерин в додекане	Эмульсия желтка
00:00	100 ± 6	100 ± 6	100 ± 7	100 ± 6	100 ± 6
00:30	97 ± 6	70 ± 4	94 ± 6	66 ± 4	100 ± 6
01:00	94 ± 5	48 ± 3	77 ± 5	34 ± 2	87 ± 6
02:00	94 ± 5	12 ± 1	63 ± 4	19 ± 1	89 ± 5

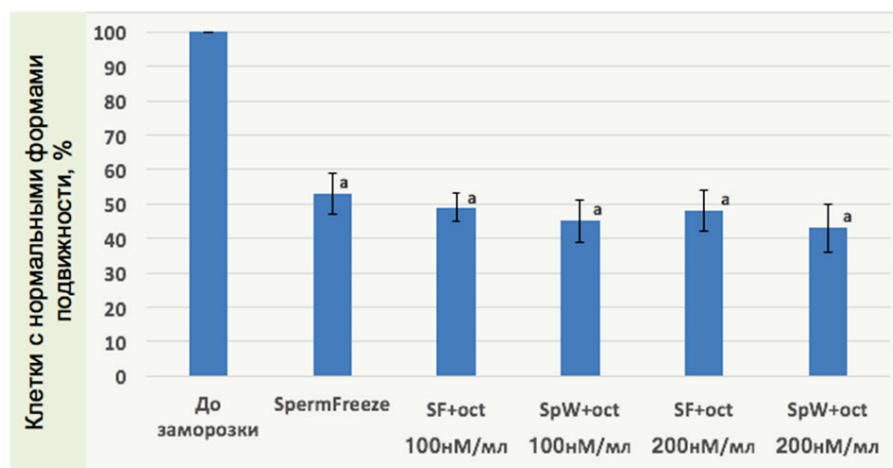
**Рисунок 1.** Оценка подвижности сперматозоидов до и после заморозки в криопротекторе SpF, а также с использованием раствора холестерина в н-октане (результат 10 экспериментов). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия

Таблица 3. Доли клеток с нормальными формами подвижности до и после криоконсервации с различными вариантами криопротектора относительно показателей образца до криоконсервации (N=15)

Вид криопротекторной среды	Нативный образец до заморозки	Sperm Freeze	SpF + эмульсия желтка	SpF + Холестерин в н-октане	SpF + β -dx-Chol	SpF + лецитин	SpF + β -dx
Индекс подвижности (%)	100 $\pm$ 5	52,6 $\pm$ 5,2 ^a	71,2 $\pm$ 5,2 ^c	48,6 $\pm$ 4,3 ^a	66,2 $\pm$ 5,4 ^{b,c}	61 $\pm$ 4,9 ^{a,b}	48,2 $\pm$ 4,8 ^a

Согласно литературным данным модификация криопротектора холестерином может быть осуществлена с помощью специальных соединений – олигомеров глюкозы – бета-циклодекстринов [10]. Циклодекстрины способны связывать холестерин, создавать с ним комплексы и увеличивать его растворимость в полярных растворителях. Поэтому нами был разработан протоколы формирования комплексов β -циклодекстрин-холестерин (β -dx-Chol) и модификации криопротектора этими комплексами. Тест на цитотоксичность показал, что ни комплексы β -dx-Chol, ни отдельно циклодекстрины не являются токсичными для сперматозоидов (через 90 минут инкубации доля жизнеспособных клеток составляла 95 $\pm$ 5%). Таким образом клетки инкубировались в течение 15 минут с комплексами β -dx-Chol (2 г/мл), а затем замораживались согласно протоколу медленной заморозки с добавлением криопротектора SpF. Для выяснения роли фосфатидилхолина при криоконсервации клеток в работе был предложен протокол модификации криопротектора SpF лецитином. Лиофилизованная пудра соевого лецитина растворялась в криопротекторе на основе глицерола в концентрации 50мг/мл, стоковый раствор добавлялся к образцу до итоговой концентрации лецитина 1,5 мг/мл (концентрация была выбрана исходя из литературных данных). Тест на цитотоксичность показал, что данный раствор также не является цитотоксичным для сперматозоидов. Результат сохранения активных форм сперматозоидов при криоконсервации с различными модификациями базового криопротектора SpF представлен в таблице 3.

Приведенные погрешности рассчитаны как стандартные ошибки среднего. Буквами a, b, c – обозначены статистически достоверно различные выборки ($p < 0,05$). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия. Из таблицы 1 видно, что ближе всего к эмульсии яичного желтка по сохранению жизнеспособных клеток является модификация базового криопротектора комплексами β -циклодекстрин-холестерин. Добавление лецитина также повышает долю жизнеспособных клеток. Для подтверждения факта выживания клеток благодаря добавлению холестерина, а не циклодекстринов, в работе были заморожены образцы клеток с циклодекстринами без холестерина. Показано, что образцы, которые инкубировались с комплексами циклодекстрин-холестерин, обладают лучшей подвижностью, по сравнению с «пустыми» циклодекстринами. Плазматические мембраны при криоконсервации претерпевают фазовый переход, деформационные нагрузки, а также структурные изменения. Модификация криопротектора яичным желтком, являющимся многокомпонентным непроницающим криопротектором, позволяет снижать степень криоповреждений плазматических мембран. Исследования целостности мембран показали отсутствие статистически значимых различий между стандартным криопротектором SpF и SpF+лецитин. При этом показатели мембраны для криопротектора SpF+желток статистически значимо были лучше. Можно сделать вывод, что криопротекторное действие яичного желтка в отношении плазматических мембран имеет комплексный характер, а не обусловлено действием одного из его компонентов. Для создания альтернативной яичному желтку модификации, не имеющей животного происхождения, возможно стоит модифицировать базовую криопротекторную среду комплексами циклодекстрин-холестерин совместно с лецитином.

Список литературы / References:

1. Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology*, 1990, vol. 27, pp. 401-415.
2. Gilmore J.A. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *HUMAN REPRODUCTION*, 1997, vol. 12, no. 1, pp. 112-118.
3. Garde J.J., Olmo A., Soler A.J., Espeso G., Roldan E.R.S., Gomendio M. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science*, 2008, no. 108, pp. 384-401.
4. Grigorieva A., Simonenko E., Garmaeva S., Mironova A. Human gametes cryopreservation with cryoprotectant modified by egg yolk. *CryoLetters*, 2019, vol. 40, no. 3, pp.187-192.
5. Grigoreva A., Garmaeva S., Yakovenko S., Simonenko E. Biophysical principles in human gametes cryopreservation: cryoprotectants modified by egg yolk. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, no. 1, pp. 70-73.
6. Meyer F., Smit B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2009, vol. 106, no.10, pp. 3654-3658.
7. Tilcock et al. Cation-dependent segregation phenomena and phase behavior in model membrane systems containing phosphatidylserine: Influence of cholesterol and acyl chain composition. *Biochemistry*, 1984, vol. 23, no. 12, pp. 2696-2703.

8. Darin-Bennett A., White I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 1977, no. 14, pp. 466-470.
9. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th edition. *Kapital print*, 2012.
10. Lone S.A. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 2018, no. 192, pp. 1-5.

MODIFICATION OF CRYOPROTECTIVE MEDIUM BY EGG YOLK COMPONENTS TO INCREASE SURVIVAL OF HUMAN SPERMATOZOA AFTER CRYOPRESERVATION

Smolenceva D.¹, Mironova A.², Sibachin A.¹, Grigorieva A.A.¹, Yakovenko S.¹, Simonenko E.Yu.¹

¹ Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory, 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ksimonenko@inbox.ru

² Semenov Institute of Chemical Physics

Kosygina st., 4, Moscow, 119991, Russia

Abstract. Cryopreservation is a modern convenient method of storing biological material. However, cryopreservation can also lead to undesirable effects caused by damage of biological material. To protect cells from damage, cryoprotective media are used, including components penetrating into the cell (glycerin, DMSO) and non-penetrating (disaccharides, proteins). Egg Yolk is a non-penetrating component. Earlier in our work, it was shown that the modification of cryoprotectants with egg yolk suspension is one of the most effective methods for improving the survival of spermatozoa. However using compounds that are received from the animal for storing human cells is difficult. In this work the protocol of preparation of an egg yolk components: lecithin and cholesterol and the scheme of basic cryoprotectant SpermFreeze modification are suggested. Cytotoxicity tests have been done for various cholesterol solvents, the concentrations of all components were selected, changes in the sperm motility index after freezing and thawing were determined in all studied modifications of the cryoprotective medium. In this paper methods for measuring cholesterol concentration in sperm membranes were compared to select the optimal protocol. It has been also shown that modification of the base cryoprotectant with cyclodextrin-cholesterol complexes increases the survival rate of spermatozoa by 13% and is effective as with the addition of a suspension of egg yolk; the addition of lecithin does not significantly increase the effectiveness of the base cryoprotector.

Key words: cryoprotectant, egg yolk, lecithin, cholesterol, sperm motility, ART.

**ТРИТЕРПЕНОИДЫ ЛУПАНОВОГО РЯДА КАК МОДУЛЯТОРЫ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС**
Дубинин М.В.¹, Семенова А.А.¹, Выдрина В.А.², Шарапов В.А.¹, Степанова А.Е.¹,
Теньков К.С.¹, Хорошавина Е.И.¹, Белослудцев К.Н.^{1,3}

¹ Марийский государственный университет
пл. Ленина, 1, г. Йошкар-Ола, 424001, РФ; e-mail: dubinin1989@gmail.com

² Уфимский Институт химии УФИЦ РАН
г. Уфа, РФ

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
г. Пуццино, РФ

Поступила в редакцию: 07.07.2020

Аннотация. В работе рассматривается влияние растительного тритерпеноида бетулина и его производного бетулоновой кислоты на митохондрии печени крыс. Установлено, что бетулоновая кислота и, в меньшей степени, бетулин активируют митохондриальное дыхание в состояниях 2 и 4 и ингибируют дыхание, стимулированное ADP и ДНФ. В этом случае эффект бетулоновой кислоты приводит к значительному снижению дыхательного контроля и коэффициента АДФ/О, а также к снижению мембранного потенциала. Эффекты обоих соединений были наиболее выражены в случае использования сукцината как субстрата дыхания. Установлено, что действие указанных агентов на функциональные показатели органелл обусловлено как протонофорным эффектом бетулоновой кислоты, так и ингибированием комплексов дыхательной цепи обоими соединениями. Оба агента также достоверно усиливали генерацию H₂O₂ в митохондриях, окисляющих сукцинат, в то время как бетулоновая кислота оказывала антиоксидантное действие в присутствии НАД-зависимых субстратов. Было также обнаружено, что бетулин индуцирует митохондриальную агрегацию. Бетулоновая кислота гораздо менее эффективно индуцировала агрегацию митохондрий. Обсуждаются возможные механизмы влияния бетулина и бетулоновой кислоты на функционирование митохондрий печени крысы.

Ключевые слова: бетулин, бетулоновая кислота, митохондрии, ингибирование, агрегация.

Поиск новых высокоэффективных препаратов является одной из актуальных задач современной биологии и медицины. К соединениям, сочетающим доступность и ценную биологическую активность, относятся вещества растительного происхождения, в том числе тритерпеноиды различной структуры [1,2]. Наиболее перспективные соединения включают в себя тритерпеноиды ряда лупана, в частности бетулин и его производные. В настоящее время считается, что бетулин и его производные обладают противовирусными (проявляют активность против ВИЧ, вируса герпеса и вируса Эпштейна-Барра), противовоспалительными, антиоксидантными и другими свойствами [3-5]. Неудивительно, что создание препаратов на основе бетулина и его производных является рассматривается как перспективное направление фармакологии и медицины.

Известно, что бетулин и его производные бетулоновая и бетулиновая кислоты проявляют выраженные цитотоксические свойства, включая ингибирующую активность в отношении различных линий раковых клеток [6-8]. Учитывая гидрофобную природу этих агентов, неудивительно, что их основными клеточными мишенями являются мембранные структуры, в частности митохондриальные мембраны. Эти органеллы играют центральную роль в энергетическом метаболизме, а также участвуют в запуске внутреннего пути клеточной гибели путем апоптоза [9]. Ключевую роль в митохондриальной дисфункции при этих патологиях играет открытие митохондриальной МРТ поры, что приводит к деполяризации органелл, набуханию матрикса, нарушению синтеза АТР и выделению проапоптотических белков из межмембранного пространства, таких как, например, цитохром *c* [9,10]. Ранее было показано, что бетулин и его производные способны вызывать окислительный стресс в митохондриях, что сопровождается открытием МРТ поры, выделением цитохрома *c* в цитоплазму с последующей активацией каспаз и иницированием гибели клеток по пути некроза или апоптоза [11,12]. Предполагается, что митохондриально-направленные эффекты лежат в основе цитотоксического действия этих соединений.

Следует отметить, что, несмотря на значительный прогресс в этой области, результаты изучения влияния бетулина и его производных на функционирование митохондрий и проницаемость их мембран фрагментарны и скорее демонстрируют долгосрочные последствия (снижение $\Delta\psi$, индукция апоптоза) без раскрытия каких-либо молекулярных мишеней и механизмов действия. Поэтому в настоящей работе нами изучены митохондриально-направленные эффекты тритерпеноидов лупанового ряда: бетулина и бетулоновой кислоты.

Эксперименты проводили на митохондриях печени лабораторных крыс, которые выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования [13]. При исследовании окислительного фосфорилирования дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом с помощью системы Oxygraph Plus (Hansatech Instruments). Применяли следующие показатели дыхания и окислительного фосфорилирования: состояние 2 – скорость дыхания митохондрий в присутствии неорганического фосфата (Φ_n) до добавления ADP; состояние 3 – скорость дыхания митохондрий в присутствии Φ_n и ADP; состояние 4 – скорость дыхания

митохондрий в присутствии Φ_n после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ (состояние 4 по Чансу); состояние $3U_{\text{днф}}$ – максимальная скорость дыхания в присутствии протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола. RC – отношение скоростей дыхания органелл в состояниях 3 и 4 (дыхательный контроль по Чансу); ADP/O – стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования. Значение коэффициента ADP/O определяли пульсовым методом [14]. Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью ТФФ⁺-чувствительного электрода. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий оценивали спектрофотометрически. Скорость образования H_2O_2 суспензией митохондрий измерялась с помощью флуоресцентного индикатора Amplex Red. Агрегацию органелл оценивали с помощью метода конфокальной микроскопии.

Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на функциональное состояние митохондрий печени крыс оценивали по скорости митохондриального дыхания в присутствии глутамат/малата (субстраты комплекса I дыхательной цепи) или сукцината (субстрат комплекса II) в присутствии ротенона. Как видно из таблиц 1 и 2, 10 и 50 мкМ бетулина оказывали незначительное влияние (изменение менее чем на 10-15%) как на сукцинат-, так и на глутамат/малат-зависимое дыхание органелл во всех функциональных состояниях, не влияя на параметр дыхательного контроля и эффективность синтеза АТФ. В то же время 5 мкМ бетулоновой кислоты уже было достаточно для активации сукцинат-зависимого дыхания органелл в состояниях 2 и 4 (на 57 и 52% соответственно) и для подавления дыхания в состояниях 3 и $3U_{\text{днф}}$ (на 16 и 8% соответственно) (не показано). При этом показатель дыхательного контроля снизился на 46%. Отношение ADP/O также обнаружило тенденцию к снижению. При использовании НАД-зависимых субстратов (2,5 мМ глутамата и 2,5 мМ малата) эффекты бетулоновой кислоты демонстрируют одинаковый тренд (табл. 2). Однако в этом случае они немного менее выражены – 20 мкМ бетулоновой кислоты вызывает снижение RC и ADP/O на 43 и 16% соответственно.

Таблица 1. Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на сукцинат-зависимое дыхание митохондрий печени крысы

Добавки	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние $3U_{\text{днф}}$	RC	ADP/O
	нмоль $O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка				отн. ед.	
Контроль	12,28±0,27	67,37±0,43	15,40±0,42	72,7±0,54	4,41±0,19	1,93±0,05
Бетулин						
10 мкМ	12,53±0,21	68,96±0,41	15,54±0,19	73,11±0,18	4,45±0,10	1,95±0,01
50 мкМ	13,73±0,14*	70,30±0,05*	17,01±0,04*	69,12±0,09*	4,13±0,09	1,87±0,02
Бетулоновая кислота						
10 мкМ	23,89±0,75*	55,07±0,01*	27,71±0,52*	63,67±0,52*	1,99±0,15*	1,39±0,11*
20 мкМ	26,73±0,02*	44,94±0,07*	35,56±1,00*	49,10±1,10*	1,28±0,21*	1,15±0,06*

Примечание. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n=3). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой ($p < 0.05$, t-тест).

Таблица 2. Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на глутамат/малат-зависимое дыхание митохондрий печени крысы

Добавки	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние $3U_{\text{днф}}$	RC	ADP/O
	нмоль $O_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка				отн. ед.	
Контроль	5,46±0,15	32,82±0,98	8,73±0,21	32,96±1,71	3,77±0,08	2,68±0,03
Бетулин						
10 мкМ	4,95±0,16	32,15±0,86	8,54±0,28	30,60±0,45	3,78±0,05	2,70±0,05
50 мкМ	5,66±0,11	31,28±0,82	9,14±0,03	27,36±0,83*	3,35±0,18	2,60±0,08
Бетулоновая кислота						
10 мкМ	5,40±0,18	26,33±0,43*	9,92±0,08*	26,34±0,71*	2,66±0,04*	2,42±0,06*
20 мкМ	6,36±0,11*	23,52±0,40*	10,98±0,09*	23,70±0,22*	2,15±0,08*	2,24±0,06*

Примечание. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n=3). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой ($p < 0.05$, t-тест).

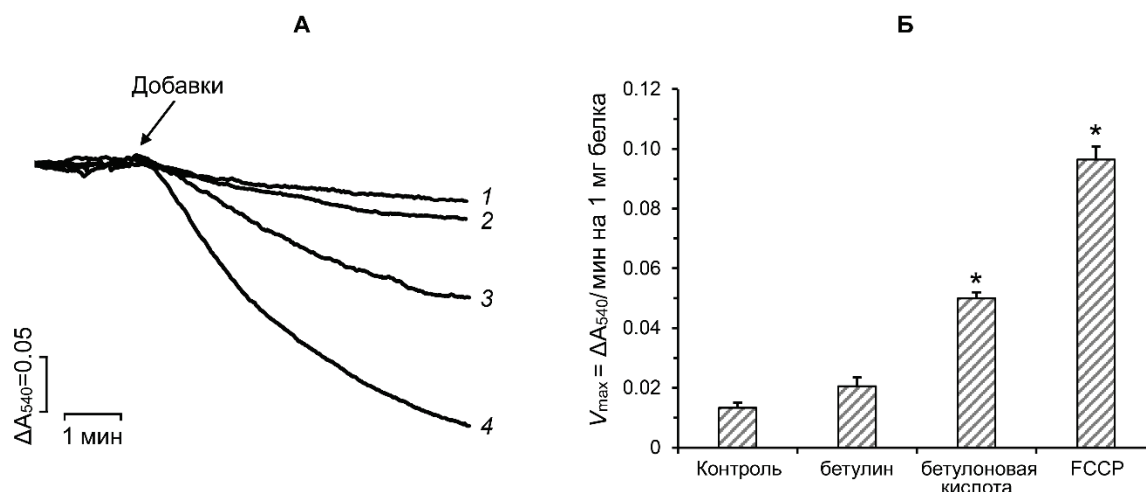


Рисунок 1. Кинетика (А) и скорость (В) набухания митохондрий печени крыс в NH_4NO_3 среде, индуцированного 20 мкМ бетулина (кривая 2), 20 мкМ бетулоновой кислотой (кривая 3) и 25 нМ FCCP (кривая 4). Кривая 1 – контроль (без добавок). На диаграммах приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (с тестируемыми агентами) является статистически значимой ($p < 0,05$, t-тест)

Наблюдаемое увеличение скорости дыхания митохондрий в состояниях 2 и 4 в присутствии тритерпеноидов может свидетельствовать о возможном протонофорном эффекте изучаемых соединений. Этот эффект может быть связан с повышенной проницаемостью митохондриальной мембраны для H^+ , индуцированной этими соединениями. Действительно, можно видеть, что бетулоновая кислота, подобно классическому протонофорному разобщителю FCCP, вызывает набухание митохондрий в изоосмотическом растворе NH_4NO_3 , что может указывать на способность этого агента увеличивать протонную проводимость митохондриальной мембраны. В то же время бетулин практически неэффективен (рис. 2).

Эти данные также подтверждены при измерении мембранного потенциала органелл в присутствии этих агентов. Установлено, что бетулоновая кислота (но не бетулин) дозозависимо индуцирует падение мембранного потенциала органелл (не показано). При этом эффект бетулоновой кислоты более выражен на митохондриях, окисляющих сукцинат.

Для дальнейшего выяснения того, что лежит в основе влияния исследуемых соединений на митохондриальное дыхание, мы исследовали их влияние на активность комплексов дыхательной цепи органелл (таблица 3). Видно, что 20 мкМ бетулина не влияет на активность комплексов I, II, III и IV. В то же время бетулин ингибировал совокупную активность комплексов II+III на 10%. 20 мкМ Бетулоновая кислота также не влияла на активность комплекса I и комплекса II, но значительно ингибировала активность комплексов III и IV (на 25 и 22% соответственно). Ингибирующий эффект бетулоновой кислоты был особенно очевиден при оценке совокупной активности комплексов II+III (ингибирование на 86%).

Ранее было показано, что бетулин и бетулоновая кислота вызывают развитие окислительного стресса в раковых клетках и в то же время не влияют на генерацию АФК в нормальных клетках [5,15]. В настоящей работе мы также исследовали влияние различных концентраций бетулина и бетулоновой кислоты на скорость образования H_2O_2 митохондриями печени крыс (рис. 2). Установлено, что при концентрациях 10–20 мкМ бетулин и бетулоновая кислота одинаково увеличивают скорость генерации H_2O_2 митохондриями, окисляющими сукцинат (рис. 2А). В случае НАД-зависимых субстратов бетулин не влиял на образование перекиси водорода (рис. 2Б). В этом случае бетулоновая кислота проявляла слабый антиоксидантный эффект, снижая образование H_2O_2 митохондриями печени крыс.

Таблица 3. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс в присутствии 20 мкМ бетулина или бетулоновой кислоты (в % от контроля)

Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV	Комплекс I+III	Комплекс II+III
Бетулин					
98,1 $\pm$ 3,2	102,6 $\pm$ 2,0	95,2 $\pm$ 3,1	98,1 $\pm$ 0,6*	100,5 $\pm$ 1,8	90,1 $\pm$ 0,6*
Бетулоновая кислота					
103,7 $\pm$ 4,8	106,8 $\pm$ 8,6	75,2 $\pm$ 5,0*	78,7 $\pm$ 0,5*	103,0 $\pm$ 2,3	14,0 $\pm$ 1,7*

Примечание. Активность комплексов в отсутствие добавок принята за 100%. Приведены средние значения $\pm$ ошибка среднего ($n=3$). *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой ($p < 0,05$, t-тест).

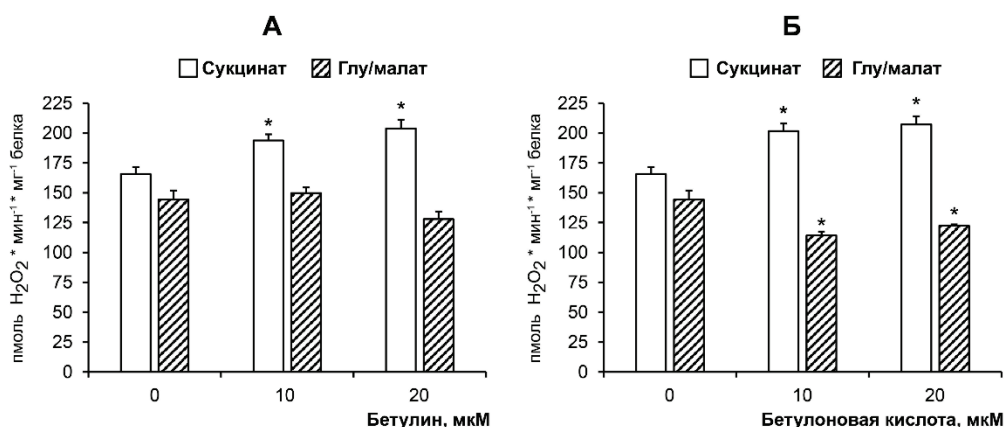


Рисунок 2. Влияние бетулина (А) и бетулоновой кислоты (Б) на скорость генерации H_2O_2 митохондриями печени крыс. В качестве субстратов для дыхания использовали 2,5 мМ глутамат + 2,5 мМ малат (А) или 5 мМ сукцинат + 1 мМ ротенон (Б). Приведены средние значения $\pm$ ошибка среднего ($n = 4$). * *Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой ($p < 0,05$, t-тест)

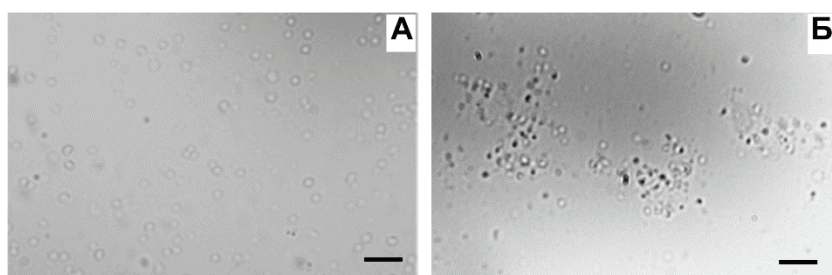


Рисунок 3. Митохондрии печени крыс в отсутствии (А) и в присутствии 50 мкМ бетулина (Б). Шкала – 10 мкм

Кроме того, нами установлено, что бетулин способен активно влиять на поверхностные свойства мембран митохондрий. Показано, что внесение бетулина к суспензии органелл приводит к их агрегации и может сопровождаться пермеабиллизацией их мембран (рис. 3). В этом случае бетулоновая кислота была гораздо менее эффективна (не показано).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что бетулин и бетулоновая кислота способны оказывать существенное влияние на функционирование митохондрий. В основе эффектов этих тритерпеноидов может лежать ингибирование активности комплексов дыхательной цепи митохондрий, а также протонофорное действие. Кроме того, бетулин способен активно индуцировать агрегацию мембран органелл. Это стоит учитывать при разработке новых высокоэффективных лекарственных агентов на основе природных тритерпеноидов лупанового ряда.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№20-015-00124) и гранта президента РФ для поддержки молодых ученых (МК-61.2019.4).

Список литературы / References:

- Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 2017, no. 27, pp. 79-132. DOI: 10.1039/b808530g.
- Kreiter J., Rupprecht A., Zimmermann L., Moschinger M., Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N., Gille L., Fedorova M., Pohl E.E. Molecular mechanisms responsible for pharmacological effects of genipin on mitochondrial proteins. *Biophys. J.*, 2019, vol. 117, no. 10, pp. 1845-1857. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.10.021.
- Matsuda H., Ishikado A., Nishida N., Ninomiya K., Fujiwara H., Kobayashi Y., Yoshikawa M. Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, vol. 8, no. 21, pp. 2939-2944. DOI: 10.1016/S0960-894X(98)00528-9.
- Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Tolstikov G.A., Tolstikov A.G., Flekhter O.B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. natural lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2006, no. 32, pp. 37-49. DOI: 10.1134/S1068162006010031.
- Król S.K., Kiełbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed. Res. Int.*, 2015, 584189. DOI: 10.1155/2015/584189
- Yang S., Zhao Q., Xiang H., Liu M., Zhang Q., Xue W., Song B., Yang S. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from *Toona sinensis* on human cancer cells. *Cancer. Cell Int.*, 2013, vol. 13, no. 1, p. 12. DOI: 10.1186/1475-2867-13-12.
- Cháirez-Ramírez M.H., Moreno-Jiménez M.R., González-Laredo R.F., Gallegos-Infante J.A., Rocha-Guzmán N.E. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. *EXCLI. J.*, 2016, no. 15, pp. 758-771. DOI: 10.17179/excli2016-642.

8. Leong K.H., Mahdzir M.A., Din M.F., Awang K., Tanaka Y., Kulkeaw K., Ishitani T., Sugiyama D. Induction of intrinsic apoptosis in leukaemia stem cells and in vivo zebrafish model by betulonic acid isolated from *Walsura pinnata* Hassk (Meliaceae). *Phytomedicine*, 2017, no. 26, pp. 11-21. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.12.018.
9. Belosludtsev K.N., Dubinin M.V., Belosludtseva N.V., Mironova G.D. Mitochondrial Ca^{2+} transport: mechanisms, molecular structures, and role in cells. *Biochemistry*, 2019, vol. 84, no. 6, pp. 593-607. DOI: 10.1134/S0006297919060026.
10. Dubinin M.V., Samartsev V.N., Stepanova A.E., Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. Membranotropic effects of ω -hydroxypalmitic acid and Ca^{2+} on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2018, vol. 50, no. 5, pp. 391-401. DOI: 10.1007/s10863-018-9771-y.
11. Fulda S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2019, vol. 53, no. 1, pp. 140-146. DOI: 10.1002/mnfr.200700491.
12. Li Y., He K., Huang Y., Zheng D., Gao C., Cui L., Jin Y.H. Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. *Mol. Carcinog.*, 2010, vol. 49, no. 7, pp. 630-640. DOI: 10.1002/mc.20638.
13. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., Pavlik L.L., Tenkov K.S., Samartsev V.N., Dubinin M.V., Penkov N.V., Yashin V.A. Study of the mechanism of permeabilization of lecithin liposomes and rat liver mitochondria by the antimicrobial drug triclosan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2018, vol. 1860, no. 2, pp. 246-271. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.09.018.
14. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.*, 1955, vol. 217, no. 1, pp. 383-393.
15. Hwang B.Y., Chai H.B., Kardono L.B., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*, *Phytochemistry*, 2003, vol. 62, no. 2, pp. 197-201. DOI: 10.1016/s0031-9422(02)00520-4.

LUPANE TRITERPENOID AS MODULATORS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIA

Dubinin M.V.¹, Semenova A.A.¹, Vydrina V.A.², Sharapov V.A.¹, Stepanova A.E.¹, Tenkov K.S.¹, Khoroshavina E.I.¹, Belosludtsev K.N.^{1,3}

¹ Mari State University

pl. Lenina, 1, Yoshkar-Ola, 424001, Russia; e-mail: dubinin1989@gmail.com

² Ufa Institute of Chemistry

Ufa, Russia

³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics

Pushchino, Russia

Abstract. The effect of plant triterpenoid betulin and its derivative betulonic acid on rat mitochondria is considered. It was found that betulonic acid and, to a lesser extent, betulin activate mitochondrial respiration in states 2 and 4 and inhibit respiration stimulated by ADP and DNP. In this case, the effect of betulonic acid leads to a significant decrease in respiratory control and the ADP/O coefficient, as well as to a decrease in membrane potential. The effects of both compounds were most pronounced when succinate was used as a respiratory substrate. It was established that the effect of these agents on the functional parameters of organelles is due to both the protonophore effect of betulonic acid and the inhibition of respiratory chain complexes by both compounds. Both agents also significantly enhanced the generation of H_2O_2 in succinate oxidizing mitochondria, while betulonic acid exerted an antioxidant effect in the presence of NAD-dependent substrates. It was also found that betulin induces mitochondrial aggregation. Betulonic acid was much less effective in this case. Possible mechanisms of the effect of betulin and betulonic acid on the functioning of rat liver mitochondria are discussed.

Key words: betulin, betulonic acid, mitochondria, inhibition, aggregation.

ГЕНОМ-ЦЕНТРИРОВАННАЯ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СИСТЕМНО-КИБЕРНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРИРОВАННАЯ МОДЕЛЬ В ЗАДАЧАХ ОПТИМАЛЬНОГО СИНТЕЗА РАЦИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Шлихт А.Г., Краморенко Н.В.

Дальневосточный федеральный университет
ул. Суханова, 8, г. Владивосток, 690091, РФ; e-mail: schliht@mail.ru
Поступила в редакцию: 08.07.2020

Аннотация. В работе рассматривается задача анализа и оптимального синтеза рационов на основе методов математического программирования и технологий искусственного интеллекта. Разработанные алгоритмы, программы, базы данных, базы знаний позволяют перекрыть все многообразие существующих диет и рационов, обеспечивая при этом требуемый сбалансированный химический состав рациона при многочисленных ограничениях на нутриенты по нормам питания, химическому составу сырья и готовых блюд; балансу кальция, магния, фосфора; насыщенных, моновенасыщенных, полиненасыщенных жирных кислот; незаменимых аминокислот (аминокислотный скор); калорийность; растительные и животные нутриенты и др., потерь тепловой обработки, различных фенотипических факторов, ограничений, связанных с заболеваниями. Рассмотренные вопросы, связанные с генетикой, геномикой, протеомикой, нутригеномикой, биохимией, позволили существенно расширить наши знания и возможности по технологиям, качеству и безопасности питания. Учет этого многообразия факторов реализован в созданной системе путем привлечения системно-кибернетической структурированной модели, построенной на основе математических моделей и информационных технологий, оперирующих сотнями нутриентов и продуктов питания.

Ключевые слова: питание, оптимальный синтез рационов, геномика, нутригеномика, искусственный интеллект, базы данных, базы знаний

Как говорил академик Сергей Капица: «Наука о питании - это наука 21 века». Современные достижения в области генетики, биохимии, информационных технологий позволили существенно расширить наши знания и возможности по технологиям, качеству и безопасности питания. В настоящее время наработаны многочисленные рекомендации в сфере питания: по нормам питания, химическому составу сырья и готовых блюд, потерь тепловой обработки, различных фенотипических факторов (возраст, рост, вес, характер физической нагрузки, генетические особенности индивида), ограничений, связанных с заболеваниями (фенилкетонурия, целиакия, галактоземия и др.). Учет этого многообразия факторов требует привлечения системно-кибернетических моделей и информационных технологий. Решающее значение в анализе и синтезе рационов имеют количественные сбалансированные оценки химического состава рациона (кальций, магний, фосфор; насыщенные, моновенасыщенные, полиненасыщенные жирные кислоты; баланс незаменимых аминокислот (аминокислотный скор); калорийность; растительные и животные нутриенты и др.), учесть это многообразие довольно сложно, учитывая сотни нутриентов и продуктов питания. В сущности, необходимо каждый раз решать задачу персонализированного питания. Но, как же достигнуть этого в условиях многочисленного контингента.

Системно-кибернетическая структурированная модель.

Целью работы является создание интеллектуальной информационной системы анализа и оптимального синтеза рациона человека [1-6]. В основу синтеза рациона положен фундаментальный системно-кибернетический подход с прямой цепью связи управления, производящей анализ произвольного рациона и цепи обратной связи, в которой осуществляется оптимальная коррекция произвольного рациона. В состав предлагаемой системно-кибернетической структурированной модели (СКСМ) на базе модели пространства состояний входят подсистемы: норм питания; анализа рациона; оценки рациона и сравнение его со стандартным по категориям; оптимальный регулятор в цепи обратной связи (рис. 1).

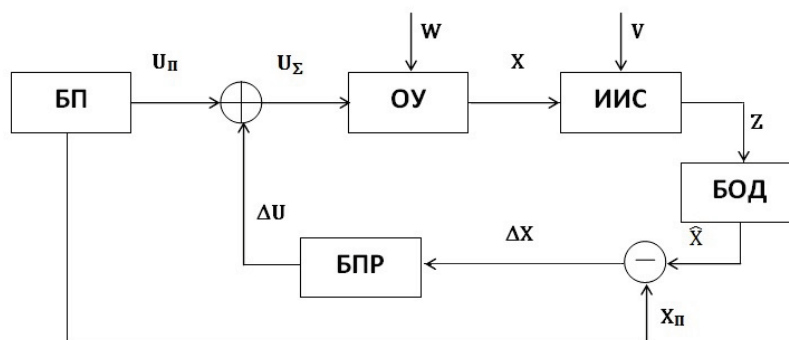


Рисунок 1. Системно-кибернетическая структурированная модель

СКСМ строится по технологии экспертных систем на основе технологии баз данных (БД) и баз знаний (БЗ) с дополнительной оптимизацией на базе методов математического программирования (реализация задачи о диете). Оптимальный регулятор в цепи обратной связи определяет дефицитные нутриенты и дает рекомендации по качественному и количественному составу дополнительных продуктов.

В СКСМ в явном виде выделяется:

БП – блок планирования формирующий нормативные требования к управляемым объектам и процессам (U_p, X_p);

ОУ – объект или процесс управления с векторами управления, состояния и возмущения (U_z, X, W);

ИИС – информационно-измерительная система с векторами измерения и ошибок измерения (Z, V);

БОД – блок оценивания и диагностирования с вектором оценки состояния ($\hat{X}$);

БС – блок сравнения оценки текущего состояния и плана ($\Delta X = \hat{X} - X_p$);

БПР – регулятор в цепи обратной связи – блок принятия дополнительных решений (ΔU).

При синтезе отдельных блоков СКСМ могут применяться различные методы формализации (алгебраические и дифференциальные уравнения, БД и БЗ, экспертные системы, и др.).

Анализ традиционных рационов.

Применительно к задаче анализа и оптимального синтеза рациона в данном случае не учитываются возмущения (отклонения химического состава продуктов), а также ошибки измерений, возникающие в процессе взвешивания и анализа химического состава продуктов. Это существенно упрощает задачу и позволяет перейти от стохастических моделей к детерминированным.

Анализ химического состава традиционного рациона производится на базе системы алгебраических уравнений:

$$X = A \cdot U, \quad (1)$$

где U – вектор потребленных продуктов в рационе; X – вектор нутриентов; $A = (a_{ij})$ – матрица $m \times n$, где a_{ij} – элементы матрицы, характеризующие количество i -го нутриента в j -ом продукте, m – количество анализируемых нутриентов, n – количество продуктов.

Оптимальный синтез корректирующих рационов.

Далее проводится сравнение с требуемым нормированным значением и определяется дефицит необходимых нутриентов $\Delta X = X - X_p$, т.е. вместо $\hat{X}$ в СКСМ используем просто X .

После этого решаем задачу оптимального синтеза покрытия дефицитных нутриентов, как уже говорилось, на базе линейного программирования [4].

Минимизировать функцию:

$$K = C^T \cdot \Delta U, \quad (2)$$

где $\Delta U \geq 0$,

$$A \cdot \Delta U \geq \Delta X,$$

$C^T = (c_1, c_2, \dots, c_n)$ – вектор-строка $1 \times n$, характеризующая стоимость соответствующих продуктов.

Для решения задач анализа и оптимального сбалансированного синтеза рациона были созданы соответствующие базы данных (БД) и базы знаний (БЗ): норм питания, сырья, рецептов блюд, химического состава сырья и конкретных блюд, норм и ограничений в питании, суточных рационов, введены формулы питания (по А.А. Покровскому). Разработанные БД и БЗ интегрированы с алгоритмами и программами реализации симплекс метода. Для учета многочисленных вышеуказанных ограничений были разработаны соответствующие запросы, которые вошли в состав дополнительных ограничений задачи линейного программирования. В качестве критерия оптимизации могут быть использованы различные критерии не только стоимости, минимизации калорий, веса, ограничений не только на нутриенты, но и на потребляемые продукты.

Задачу оптимального синтеза можно было бы решать, однократно, без обратной связи, но в этом случае получаются далекие от реальности рационы с преобладанием какого либо продукта (например, минимальной цены).

Все операции в интеллектуальной системе максимально автоматизированы.

Генотип–Фенотип.

Другой важной особенностью современной теории и практики питания является учет геномного статуса индивида [3]. Синтез рациона необходимо строить исходя из генетических особенностей (мутаций) в геноме человека. Мутации в кодируемых генах дают мутации в соответствующих белках. Если этот белок фермент, то происходит нарушение биохимических реакций, в которых участвует фермент, далее нарушение работы метаболических путей и физиологических процессов, в частности, происходит избыточное накопление метаболитов, которые являются причиной заболевания. Здесь важно учесть последствие генетических отклонений и создать, если они связаны с питанием, соответствующие рационы. Для этих целей были созданы БД (на основе слабоструктурированных данных международных порталов, в созданной системе эти данные прошли высокую степень структуризации и помещены в локализованные БД и БЗ): БД генома, транскриптома, протеома, мутаций для определения геномного статуса индивида, БД реакций, метаболических путей, орфанных заболеваний, а также многочисленные ассоциации между ними. Важны первичные данные, они берутся из

справочников или экспресс анализа. Создана оболочка экспертной системы с глубокими знаниями [5], интегрирующая как математические модели, так и технологию БД и БЗ. Для удобства работы с разработанными системами (базами данных и знаний) специалистам, не владеющим информационными технологиями, разработан специальный визуальный диалоговый интерфейс. В основу интерфейса положены простые графические конструктивы визуального программирования. Локализация БД позволила отойти от интерактивного общения с международными порталами и обеспечила высокий уровень локальной автоматизации при работе с данными и знаниями, обеспечивая при этом сквозное прохождение информации между всеми подсистемами. Созданные БД и БЗ позволяют проводить комплексный анализ и синтез рационов в системе ГЕНОТИП – ФЕНОТИП, а также решать задачи, связанные с нутригенетикой, нутригеномикой, токсикогеномикой, фармакогеномикой, орфанными заболеваниями. Разработанная интегрированная система является логическим продолжением системы ГЕНОТИП – СРЕДА ОБИТАНИЯ – ФЕНОТИП [7,8]. Многочисленные разработанные подсистемы функционируют в Центре гигиены и эпидемиологии Приморского края, санаториях Приморского края и других организациях.

Заключение.

Созданная система позволяет эффективно проанализировать и реализовать любую существующую диету, для этого необходимо только ввести данные из созданных БД, ограничения на первичные продукты. В случае, если не удастся синтезировать рацион на базе традиционных продуктов (превышение массы, калорий, ограничения в продуктах и нутриентах), то можно добавлять в модель соответствующие витамины. Система сама определит, что и в каком количестве подходит для синтеза рациона.

Достоинством разработанной системы является то, что она не ограничивает индивида строгими рамками рациона, который получается на базе оптимальной задачи о диете, а позволяет питаться по традиционной схеме питания, но с дополнительными нутриентами, получаемыми в цепи обратной связи для коррекции рациона. Как правило, это составляет значительно меньшую долю общих затрат на питание, но требует более строгого подбора сырья и готовых продуктов, а также дисциплины питания.

Список литературы / References:

1. Шлихт А.Г. Интегрированная экспертная система анализа и оптимального синтеза рационов. Материалы XIII Всероссийского конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Персонализированная диетология: настоящее и будущее», Москва, 5-7 декабря 2011. *Вопросы диетологии*, 2011, т. 1, № 2, с. 100. [Shliht A.G. Integrirrovannaya ekspertnaya sistema analiza i optimal'nogo sinteza racionov. Materialy XIII Vserossiyskogo kongressa dietologov i nutriciologov s mezhdunarodnym uchastiem «Personificirovannaya dietologiya: nastoyashchee i budushchee», Moskva, 5-7 dekabrya 2011. *Voprosy dietologii*, 2011, vol. 1, no. 2, p. 100. (In Russ.)]
2. Шлихт А.Г. Интегрированная биомедицинская информационная система постгеномного мониторинга среды обитания и здоровья человека. Материалы XIV Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием «Алиментарно-зависимая патология: предиктивный подход», М.: 3-5 декабря, 2012, т. 2, прил. № 1, с. 95-96. [Shliht A.G. Integrirrovannaya biomeditsinskaya informacionnaya sistema postgenomnogo monitoringa sredy obitaniya i zdorov'ya cheloveka. Materialy XIV Vserossiyskogo Kongressa dietologov i nutriciologov s mezhdunarodnym uchastiem «Alimentarno-zavisimaya patologiya: prediktivnyj podhod», M.: 3-5 dekabrya, 2012, vol. 2, supl. № 1, pp. 95-96. (In Russ.)]
3. Шлихт А.Г. Геномика, протеомика, метаболомика, нутригеномика и оптимальный синтез рационов. Материалы VIII Российского форума «Здоровое питание с рождения. Медицина, образование, пищевые технологии. Санкт-Петербург, 2013», с. 60-61. [Shliht A.G. Genomika, proteomika, metabolomika, nutrigenomika i optimal'nyj sintez racionov. Materialy VIII Rossiyskogo foruma «Zdorovoe pitanie s rozhdeniya. Medicina, obrazovanie, pishchevye tekhnologii. Sankt-Peterburg, 2013», pp. 60-61. (In Russ.)]
4. Банди Б. *Основы линейного программирования*: Пер с англ. М.: Радио и связь, 1989, 176 с. [Bandi B. *Osnovy linejnogo programmirovaniya*: Per s angl. M.: Radio i svyaz', 1989, 176 p. (In Russ.)]
5. Shlikht A.G., Kramorenko N.V. "Deep bioinformatics expert system of analysis, modeling and interpretation of omics BigData of the human genome", The 3rd International Symposium "Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology (MM-HPC-BBB-2018)". Novosibirsk, 2018, p. 66.
6. Shlikht A.G., Kramorenko N.V. "Artificial intelligence in the problems of analysis and interpretation of omics human data", The 11th International Conference "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS/SB-2018)". Novosibirsk, 2018, p. 78.
7. Шлихт А.Г., Краморенко Н.В. *Автоматизация процессов мониторинга и управления состоянием окружающей среды и здоровья человека*. Владивосток: Издательство ТГЭУ, 2007, 324 с. [Shliht A.G., Kramorenko N.V. *Avtomatizatsiya processov monitoringa i upravleniya sostoyaniem okruzhayushchej sredy i zdorov'ya cheloveka*. Vladivostok: Izdatel'stvo TGEU, 2007, 324 p. (In Russ.)]
8. Шлихт А.Г., Краморенко Н.В. *Цифровизация геном-центрированных метаболических процессов живых организмов*. Матер. всеросс. конф. с междунар. участ. «Биотехнология – медицине будущего», 2017, с. 114. [Shliht A.G., Kramorenko N.V. *Cifrovizatsiya genom-centrirovannyh metabolicheskikh processov zhivykh organizmov*. Mater. vseross. konf. s mezhdunar. uchast. «Biotekhnologiya – medicine budushchego», 2017, p. 114. (In Russ.)]

GENOME-CENTERED INTELLIGENT SYSTEM-CYBERNETIC STRUCTURED MODEL FOR OPTIMAL SYNTHESIS OF HUMAN DIETS

Shlikht A.G., Kramorenko N.V.

Far Eastern Federal University,

Sukhanova str., 8, Vladivostok, 690091, Russia; e-mail: schliht@mail.ru

Abstract. The problem of analysis and optimal synthesis of diets based on mathematical programming methods and artificial intelligence technologies is considered. The developed algorithms, programs, databases, knowledge bases allow you to cover all the variety of existing diets, while providing the required balanced chemical composition of the diet with numerous restrictions on nutrients according to nutrition standards, the chemical composition of raw materials and ready meals; the balance of calcium, magnesium, phosphorus; saturated, monounsaturated, polyunsaturated fatty acids; essential amino acids (amino acid score); caloric content; plant and animal nutrients, etc., heat treatment losses, various phenotypic factors, restrictions related to with diseases. The discussed issues related to genetics, genomics, proteomics, nutrigenomics, biochemistry, allowed us to significantly expand our knowledge and capabilities in technology, quality and food safety. Consideration of this variety of factors is implemented in the created system by using a system-cybernetic structured model built on the basis of mathematical models and information technologies that operate with hundreds of nutrients and food products.

Key words: nutrition, optimal synthesis of diets, genomics, nutrigenomics, artificial intelligence, databases, knowledge bases.

ВЫБОР МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ЛОКАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКЕ

Григорьян А.Л.¹, Золотавина М.Л.²

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: ¹ms.bucky@mail.ru, ²zolotavina_m@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. В работе приведен обзор методов определения активности ферментов шести классов с учетом их локализации в клетке. В ходе исследования была определена субклеточная локализация ферментов разных классов и выявлено, что большая их часть сосредоточена в цитоплазме и на клеточной мембране, т.к. им присущ широкий спектр функций. Наименьшее число ферментов расположено на рибосомах и в ядерном экстракте, что связано с их специфическими действиями в клетке. Нами были проанализированы методы определения активности ферментов, которые разделены на часто и редко применяемые в клинической биохимии. Такое разделение обосновано основными характеристиками методов и главным критерием – эффективностью полученного результата. В первую группу включены методы спектрального анализа (спектрофотометрия, фотометрия и т.п.) и колориметрии (на основе цветных реакций). Во вторую группу входят методы поляриметрии, ядерно-магнитного резонанса, рентгеноструктурного анализа и т.п.

Ключевые слова: клеточная мембрана, цитоплазма, митохондрии, лизосомы, рибосомы, ядро, УФ-кинетический метод, спектрофотометрия, метод ЯМР, метод ЭПР, электрохимические методы, колориметрия.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс катализа представляет собой явление, в ходе которого изменяется скорость химического взаимодействия под влиянием ферментов – белков, выполняющих роль биологических катализаторов. Действие ферментов обусловлено изменением энергетики химических реакций, т.е. их тепловым выходом. С другой стороны, этот механизм неразрывно связан с активным центром и процессами в нем. Детектирование этих процессов возможно методами клинической биохимии. Различные группы методов позволяют изучать скорость химических реакций и определять высоту энергетического барьера, отслеживать процесс связывания субстратов с активными центрами ферментов и т. д.

Методы определения активности ферментов внедрены в медицинскую практику давно. Изучение активности ферментов дает представление о биохимических процессах на клеточном уровне [4, 13] и позволяет определить в динамике образование адаптивных ферментов и наблюдать за конститутивными ферментами.

При выборе метода исследования, как инструмента для достижения цели необходимо учитывать ряд показателей, которые могут влиять на результат и проведение опыта или эксперимента. Основными показателями в выборе предпочтения метода являются: точность, скорость анализа, область применения, качество и эффективность, способы детектирования результата и др. [8]. Изменение каталитической эффективности ферментов реализуется различными механизмами, на которые дают ответ другие компоненты клетки, поэтому одной из задач любого исследования является оценка эффективности метода, которая заключается в точном определении активности конкретного фермента и проведении параллели между его концентрацией и клиническими проявлениями нарушений метаболизма.

Практическая значимость метода состоит в получении точного результата и его верного истолкования. Научной значимостью метода выступает его модернизация, разработка на его основе новейших способов определения активности и их внедрение в медицинскую и клиничко-биологическую практику [8].

Для определения активности ферментов используют различные группы методов: электрохимические (потенциометрия, вольтамперметрия), свето-эмиссионные (спектрофотометрия, поляриметрия, фотометрия), спектроскопические (ядерно-магнитный резонанс, электронно-парамагнитный резонанс), химические (реакции окрашивания, осаждения), агглютинационные (радиоиммунологические, связывание с лигандами), ДНК-методы (метод ПЛР, метод ПДРФ) и др. Использование методов определяется их качественными характеристиками, упомянутыми ранее, и свойствами классов ферментов (функция и локализация).

Принятая Международным союзом биохимии и молекулярной биологии в 1961 году классификация разделяет шесть классов ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Каждый класс ответственен за определенный тип катализируемой реакции [1, 13]. Ниже представлен перечень химических реакций и классы ферментов, благодаря деятельности которых они и осуществляются.

Окислительно-восстановительные реакции реализуются с помощью класса Оксидоредуктаз. Они действуют на различные группы ($-CH-OH$, $CH-NH_2$ и др.). К ним относят каталазу, пероксидазу, дегидрогеназы, оксигеназы и т.д.

Перенос функциональных групп осуществляется ферментами класса Трансфераз. Они катализируют процесс переноса отдельных групп между молекулами. Например, трансаминазы, метилтрансферазы и т.д.

Гидролитические реакции выполняются благодаря работе ферментов класса Гидролаз. К ним относят все

пищеварительные ферменты: пепсин, трипсин, амилаза и др.

Реакции присоединения по месту двойных связей с образованием воды реализуются классом Лиаз, при этом такие ферменты не действуют на макроэргические соединения. Например, фумараза, аденилатциклаза.

Взаимопревращения оптических и геометрических изомеров регулируются ферментами класса Изомераз. Они изменяют структуру молекулы, сохраняя и ее свойства, и собственные. К ним относят фосфоглюкоизомеразу.

Ферменты, действующие на макроэргические молекулы, работают с использованием энергии АТФ и действуют по принципу слияния молекул с образованием ковалентной связи – класс Лигаз: ДНК-лигаза, цитрантсинтаза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – определение активности ферментов шести классов в органоидах клетки.

Данные для исследования были собраны благодаря накопленным знаниям, актуальным литературным изданиям в области биологической физики и химии. На их основе были определены функции фермента в органоидах клетки и проведен сравнительный анализ метода определения активности фермента и его субклеточной локализации.

Аналогии между особенностями методов исследования и клеточными субъединицами были осуществлены благодаря теоретическим методам: литературному и системному анализу, обобщению.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования мы обнаружили взаимосвязь между локализацией ферментов и функцией, которую они выполняют. Зависимость обусловлена функционалом тем клеточным органоидом, в котором залегают ферменты, в связи с чем он обладает рядом специфических свойств.

К функциям клеточной мембраны традиционно относят барьерную, защитную, транспортную функции. На их поддержание работают около 20% всех ферментов клетки. Они выступают в роли гидролитических катализаторов (K^+-Na^+ -АТФ-аза), рецепторов (аденилатциклаза), регулируют метаболические функции (щелочная фосфатаза), синтетические (креатинкиназа) и окислительные (цитохром р450, алкогольдегидрогеназа). Таким образом, мембранные ферменты тесно связаны с поддержанием структурных особенностей клетки и давления жидкости внутри нее, а также регуляция ионно-обменных процессов через каналы [2, 13].

В цитоплазме сосредоточено примерно 30% ферментов клетки, т.е. большая часть. Они участвуют в реализации процессов гликолиза (альдолаза, фосфоглюкоизомеразы), пентозного цикла (транскетолаза), транспорта функциональных групп (ДНК-метилтрансфераза, АЛТ). Функции ферментов обусловлены ролью цитоплазмы: поддержание осмотического давления, метаболизм, обеспечение взаимодействия органоидов [2, 10]. Благодаря своим свойствам цитоплазматические ферменты первыми реагируют на воспалительные процессы в клетке, выходят из нее, тем самым влияя на воспаление [4].

Митохондрии – энергетические станции клетки, обеспечивающие деятельность остальных структурных элементов [1, 2]. В митохондриях сосредоточено около 15% ферментов. Часть из них расположены в розовом веществе, т.е. в матриксе, другая часть на стенке мембраны. Матриксные ферменты поддерживают работу систем окисления пирувата, жирных кислот, цикла трикарбоновых кислот (цитратсинтаза). На внутренней мембране лежат ферменты окислительного фосфорилирования (АТФ-синтаза) и дыхательной цепи [13]. В межмембранном пространстве и на внешней мембране осуществляется транспорт различных функциональных групп (например, АЛТ).

Лизосомы отвечают за клеточное пищеварение, в связи с чем в них поддерживается кислая среда. К ферментам лизосом относят рН-зависимые ферменты, остро реагирующие на изменение водородного показателя. Около 10% ферментов клетки (фосфолипаза) выполняют гидролитическую функцию в лизосомах [1, 13]. Также в лизосомах залегают ферменты, поддерживающие ее кислую среду (протонная АТФаза), и ферменты, отщепляющие фосфатные группы (кислая фосфатаза).

Рибосомальные ферменты (5%) служат для осуществления синтеза белка. К таким ферментам относят: рибонуклеазу, АРСазу. Процесс синтеза белка также связан с трансферазами (например, пептидилтрансферазой), т.к. они осуществляют механизм протонного челнока и изменяют конформацию белка [13].

Ферменты ядра (6-7%) необходимы для процесса репликации ДНК (например, ДНК-полимераза α). В розовом веществе ядра (матриксе) осуществляются основные процессы синтеза, процессинга и транспорта РНК, поэтому в нем содержатся и РНК-зависимые ферменты, количество РНК при этом пропорционально влияет на активность ферментов [13].

В основе любого метода заложен принцип работы, позволяющий осуществлять необходимый анализ. Принципы основываются на законах биологической физики, физических понятиях об основных световых проявлениях, на химическом взаимодействии молекул и т.д.

Согласно А. Н. Ремизову [9], ферменты биологических мембран должны регистрироваться теми методами, которые позволяют детектировать потенциал, его изменение, поглощение и испускание света. Для этого подходят электрохимические методы (в частности потенциометрия), ими определяют активность таких ферментов как

пероксидаза, холинэстераза; свето-эмиссионные методы (спектрофотометрия, флуорометрия, ЯМР), ими можно определить активность оксидоредуктаз (цитохром р450), лиаз (аденилатциклаза).

Как было отмечено, цитохром р450 исследуют методом флуоресцентного анализа. Его кинетику измеряют в максимуме поглощения при длине 450 нм [4,5]. Однако часто отмечается явление тушения флуоресценции, которое снижается при добавлении в систему ингибитора (например, низкий pH среды). А. С. Рубин [11] рассматривает метод ЭПР как решение данной проблемы, т.к. метод позволяет исследовать флуоресцирующие соединения в присутствии жидкого гелия без дополнительных ингибиторов.

Спектральные методы позволили определить активность мембранных ферментов (например, семейства цитохромов) и выявить, что наибольшая их активность отмечается в менее вязком липидном слое, т.е. было открыто влияние ферментов на характер упаковки углеводородных цепей в липидном слое.

Следует также отметить колориметрию, которую применяют для определения активности некоторых трансфераз – креатинкиназы [12]. Достоинствами реакций окрашивания является простота эксплуатации и скорость анализа, что дает возможность в короткие сроки получать результат и динамически отслеживать активность фермента во времени. Но ввиду относительно низкой эффективности и точности колориметрии постепенно вытесняется спектральными и фотометрическими методами исследования.

Цитоплазматические ферменты – самая распространенная группа внутриклеточных включений. Быстрое изменение электронного состояния молекул ферментов приводит к конформационно-релаксационной концепции ферментативного катализа, что связано с термодинамическими константами процесса и его направленностью [10, 13]. Кинетику механизма ферментативного катализа можно описать с помощью системы дифференциальных уравнений с концентрациями взаимодействующих веществ в качестве переменных, что обуславливает наибольшую эффективность кинетического анализа при их изучении. Его реализация осуществляется с применением УФ-излучения и излучения в видимой области [10].

Таким образом, для определения активности цитоплазматических ферментов чаще всего используют свето-эмиссионные и химические методы ввиду их простоты, скорости и точности [3]. Спектральные методы анализа (спектрофотометрия, ЯМР) применяют для гидролитических ферментов (пепсин), ферментов гликолиза (альдолаза), ферментов-трансфераз (гликогенсинтаза, АНАТ), УФ-кинетический для изоферментов трансфераз (АСТ).

Определение активности ферментов-изомераз (например, фосфоглюкоизомеразы) осуществляется с помощью поляриметрического метода анализа, который является уникальным и применяется только для изометрических энзимов, локализованных в цитоплазме [6]. Поляриметрия позволяет изучать не только активность фермента, но и удельное вращение, т.е. хиральность. Модернизированный метод, спектрополяриметрия, основан на применении различных светофильтров, благодаря ему была найдена линейная зависимость величины удельного вращения от длины волны [6].

Химические методы реализуются только реакциями окрашивания, что связано с изменением структуры молекулы при добавлении функциональной группы. Колориметрический метод широко используется в небольших опытах из-за его низкой себестоимости и доступности материала и оборудования.

Деятельность митохондриальных ферментов связана с поглощением и изучением энергии молекулами, с особенностями строения самих митохондрий и системы электрон-транспортной сети [1]. Активность митохондриальных ферментов зависит от общей концентрации липидов, что связано с их строгой специфичностью по отношению к полярным головкам липидов. Это обуславливает применение ЯМР и ЭПР методов, позволяющих определять атомарный состав и поведение ферментов в растворе с различными ингибиторами. Переокисление липидов ведет к изменению активности ферментов с тиоловыми SH-группами (цитратсинтаза) [7]. Для определения ее активности метод должен включать в себя понятия кинетики реакции, возможность детектирования процессов окисления и восстановления. Поэтому применяются спектрофотометрические методы.

Трансформация энергии в митохондриях осуществляется с помощью АТФ-синтазы. Механизм ее действия связан с разностью электрохимических потенциалов на мембране. Использование потенциометрического метода позволяет определять активность АТФ-синтазы благодаря создаваемой ей разности потенциалов.

Лизосомы содержат гидролитические ферменты, их деятельность тесно связана с поддержанием кислотности среды и с количеством посторонних частиц в растворе. Определение активности ферментов осуществляется методом pH-метрии (амилаза, кислая фосфатаза), который учитывает оба признака и позволяет точно производить расчет [13]. Однако согласно другим источникам [8], более эффективными являются методы ЯМР, которые наиболее точные и специфичные, несмотря на свою дороговизну и длительность анализа.

Наиболее эффективные результаты исследования фермент-субстратных взаимодействий кристаллических ферментов (трипсин, уреазы) были получены методом рентгеноструктурного анализа. Таким образом были получены координаты атомов фермента и субстрата и оптимизированы. После обработки и составления дифференциальных уравнений были получены значения активности и произведен анализ их величины с конформацией отдельных фрагментов ферментов.

Химотрипсин и трипсин были исследованы [6] с применением радиоизотопных меток, вследствие чего была выявлена динамическая кривая его активности в зависимости от концентрации изотопа йода в растворе.

Рибосомальные и ядерные ферменты находятся в очень малых количествах, поэтому их определение стандартными свето-эмиссионными (спектрофотометрическими) методами затруднено ввиду их недостаточной точности, однако методы ЯМР, несмотря на свою стоимость, позволяют анализировать структуру молекул и

следить за их динамикой. В настоящее время определение ядерных ферментов осуществляется ДНК-методами (например, ПЛР) и встречается чаще ввиду точности, эффективности метода и малых объемов реагентов [14].

Модернизация метода ЭПР в метод спин-меток позволила определять активность рибосомальных ферментов и ориентации их химических связей; в основе метода – связывание известного парамагнитного соединения с исследуемой молекулой [9].

У рибосомальных ферментов отмечается высокая напряженность поля вследствие образования локальных электрических полей за счет концентрации диполей пептидных связей [13]. Это свойство позволяет определять их не только методом ЭПР, но и простыми электро-химическими методами: например, вольтамперметрия. Полученная величина измеряется в В/см и переводится в стандартные единицы активности.

По результатам проведенного исследования были сделаны следующие выводы.

1. Функции ферментов связаны с типом катализируемой ими химической реакции и их локализацией в клетке. Понимание этой взаимосвязи дает наиболее полное представление о метаболических процессах в клетке и способах реализации основных биохимических механизмов.

2. Локализация ферментов неоднородна и зависит от специфики органоида. Ввиду этого больше всего ферментов сосредоточено в крупных структурах (цитоплазма и клеточная мембрана), меньшее количество представлено в уникальных органоидах (ядро, рибосомы).

3. В настоящее время в клинической биохимии представлен широкий спектр методов определения активности ферментов. Они варьируют от простых и недостаточно точных (колориметрия) методов до высокоэффективных (метод ЯМР, рентгеноструктурный анализ). Такое количество методов позволяет исследовать активность ферментов на разном уровне, сравнивать полученные результаты и выявлять наиболее эффективные и подходящие конкретному ферменту методы.

Таким образом, в ходе исследования была выявлена взаимосвязь между субклеточной локализацией фермента и методом клинической биохимии для определения его активности. Эта взаимосвязь определяется функциями отдельных органоидов клетки и самих ферментов, а также индивидуальными параметрами метода. Широкий спектр методов позволяет исследователю совершить правильный выбор, сравнивая характеристики и оценивая эффективность каждого метода.

Список литературы / References:

1. Биохимия: учебник под ред. Северина Е.С. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016, 768 с. [*Biochemistry: textbook ed. by Severin E.S., M.: GEOTAR-Media, 2016, 768 p. (In Russ.)*]
2. Гистология, эмбриология, цитология: учебник под ред. Афанасьева Ю.И., Юриной Н.А. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016, 800 с. [*Histology, embryology, cytology: textbook ed. by Afanaseva U.E., Urina N.A. M.: GEOTAR-Media, 2016, 800 p. (In Russ.)*]
3. Емельянов В.В., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н. Биохимия: учебное пособие. Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2016, 132 с. [Emelyanov V.V., Maksimova N.E., Mochulskaya N.N. *Biochemistry: study guide. Ekaterinburg: Ural Uni. Publ. House, 2016, 132p. (In Russ.)*]
4. Клиническая фармакология: учебник под ред. Кукеса В.Г., Сычева Д.А. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017, 1024 с. [*Clinical pharmacology: textbook ed. by Kukes V.G., Sychev D.A. M.: GEOTAR-Media, 2017, 1024 p. (In Russ.)*]
5. Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.А., Шумянцева В.В. Метода определения функциональной активности изоферментов цитохрома р450. Биомедицинская химия, 2018, т. 64, с. 149-168. [Kuzikov A.V., Masamreh R.A., Archakov A.A., Shumyantseva V.V. Methods for determining of cytochrome p450 isoenzymes functional activity. *Biomeditsynskaya himiya*, 2018, vol. 62, no. 62, pp. 149-168. (In Russ.)]
6. Кулаков В.Н., Коршунов В.Б., Трифоненкова Н.К., Баженова Т.Л., Сорокин В.П., Седов В.В. Получение и свойства химотрипсина и трипсина, меченных радиоизотопами йода. Вопросы медицинской химии, 1985, т. 5, с. 98-100. [Kulakov V.N., Korshunov V.B., Trifonenkova N.K., Bajenova T.L., Sorokin V.P., Sedov V.V. Isolation and properties of chymotrypsin and trypsin labeled with iodine radioisotopes. *Voprosy meditsinskoy himii*, 1985, vol. 5, pp. 98-100. (In Russ.)]
7. Масловская А.А. Механизм развития кетоза при сахарном диабете и голодании. Журнал Гродненского государственного медицинского университета, № 3, 2012, с. 8-10. [Maslovskaya A.A. Mechanism of ketosis in diabetes mellitus and starvation. *Journal Grodno state medical university*, no. 3, 2012, pp. 8-10. (In Russ.)]
8. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии под ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013, 848 с. [*Principles and techniques of biochemistry and molecular biology ed. by K. Wilson, J. Walker. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2013, 848 p. (In Russ.)*]
9. Ремизов Н.А. Медицинская и биологическая физика: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013, 648 с. [Remizov N.A. *Medical and biological physics: textbook. M.: GEOTAR-Media, 2013, 648 p. (In Russ.)*]
10. Рубин А.Б. Биофизика: т. 1. Теоретическая биофизика: учебник. М.: Из-во МГУ; из-во «Наука», 2004, 448 с. [Rubin A.B. *Biophysics: vol. 1. Theoretical biophysics: textbook. M.: MGU publ. house: «Nauka» publ. House, 2004, 448 p. (In Russ.)*]
11. Рубин А.Б. Биофизика: т. 2. Биофизика клеточных процессов: учебник. М.: Из-во МГУ; из-во «Наука», 2004, 469 с. [Rubin A.B. *Biophysics: vol. 2. Biophysics of cellular processes: textbook. M.: MGU publ. house: «Nauka» publ. House, 2004, 469p. (In Russ.)*]
12. Яковлева Г.Е. Ферменты в клинической биохимии: пособие для врачей. Новосибирск: ЗАО «Вектор-

Бест», 2005, 44 с. [Yakovleva G.E. *Enzymes in clinical biology: guide for doctors*. Novosibirsk: ZAO «Vector-Best», 2005, 44 p. (In Russ.)]

13. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company, 2017, 1328 p.

14. Weidmann J., Schnölzer M., Dawson P.E., Hoheisel J.D. Copying life: synthesis of an enzymatically active mirror-image DNA-ligase made of D-amino acids. *Cell Chemical Biology*, 2019, no. 26. pp. 645-651.

CHOICE OF A METHOD FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF ENZYMES OF DIFFERENT CLASSES, DEPENDING ON THEIR LOCALIZATION IN THE CELL

Grigoryan A.L.¹, Zolotavina M.L.²

Kuban State University

Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: ¹ms.bucky@mail.ru, ²zolotavina_m@mail.ru

Abstract: The labor is given an overview of methods for determining the activity of enzymes of six classes in the view of its localization in the cell. During the research we determined the subcellular localization of enzymes of different classes and it was revealed that the most of them are concentrated in the cytoplasm and on the cell membrane, because they have wide range of effects. The smallest number of enzymes is located on the ribosomes and in the nuclear extract, which is associated with their specific functions. We also have analyzed methods of determining the activity of enzymes and it was divided into widely and narrowly used groups. The separation is justified by the main characteristics of the methods and the main criterion is the effectiveness of the result. The first group includes spectral methods (spectrophotometry, photometry, etc.) and the colorimetry (based on color reactions). The second group includes methods of polarimetry, nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction analysis, etc.

Key words: cell membrane, cytoplasm, mitochondria, lysosomes, ribosomes, nuclear, UV-kinetic methods, spectrophotometry, method of NMR, method of ESR, methods of electrochemistry, colorimetry.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ МЕТАБОЛИЗМА ЖНЭ В ОРГАНИЗМЕ ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТОДАМИ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Прокопенко Т.А.¹, Нечипуренко Н.И.¹, Коваленко М.Н.², Пашковская И.Д.¹,
Патапович М.П.², Зажогин А.П.²

¹ Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии
ул. Ф. Скорины, 24, г. Минск, 220114, Беларусь; e-mail: zajogin_an@mail.ru

² Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Беларусь

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. Изучена морфология образцов высохшей плазмы крови больных с дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) головного мозга. Выявлены структурные особенности высохших капель плазмы крови пациентов с диагнозом ДЭ мозга различной степени до и после надвенно и внутривенно лазерного облучения крови. Показана возможность уточнения диагноза по отнесению опухоли к различным типам. Получены полуколичественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохшей капли биологических жидкостей и в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Методом атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии проведен анализ образцов плазмы крови пациентов. Дана интегральная оценка метаболизма жизненно необходимых элементов (ЖНЭ). Обнаружено значительное повышенное содержание алюминия, железа, кальция, цинка и пониженное по магнию у всех пациентов как до операции, так и после. Выявленные микроэлементозы могут влиять на особенности клинического течения заболевания и обосновывают целесообразность дополнения терапии медикаментозными комплексами для коррекции минерального обмена. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и выработки системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: атомно-эмиссионный спектральный анализ, плазма крови, биологическая жидкость, морфология капли, лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия, пространственное распределение кальция, послойный анализ.

Ишемические повреждения головного мозга, главным образом, цереброваскулярная болезнь, расценивается в настоящее время как синдром острого и хронического повреждения мозга. Ввиду высокой распространенности ишемическая болезнь мозга представляет собой серьезную медико-социально-экономическую проблему. Особенно актуальным является изучение возникновения артериальной аневризмы головного мозга, как основной причины развития геморрагического инсульта. Это обуславливает поиск патогенетически обоснованных методов лечения внутримозговых катастроф.

Возникновение дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) всегда является результатом целого комплекса патофизиологических воздействий. Сюда относятся и нарушения функционально-морфологических свойств сосудов мозга, и дисрегуляция системной гемодинамики и гемостаза организма.

В настоящее время цереброваскулярные заболевания ишемического генеза являются серьезной проблемой, до сих пор не нашедшей окончательного решения. Распространенность сосудистых заболеваний головного мозга неуклонно растет во всем мире и, в том числе, в Республике Беларусь.

Дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭ), отнесенная к хроническим нарушениям мозгового кровообращения – прогрессирующее хроническое диффузное или мультифокальное нарушение мозгового кровообращения, проявляющееся неврологическими синдромами и когнитивными нарушениями, которое относится к числу наиболее распространенных сосудистых заболеваний, нередко начинаясь в трудоспособном возрасте. Наиболее частыми причинами сосудистой энцефалопатии являются атеросклероз артерий и артериальная гипертензия [1].

Дисциркуляторную энцефалопатию подразделяют на 3 стадии в зависимости от выраженности клинических симптомов. Первая стадия ДЭ характеризуется субъективными и вегетативными расстройствами, но иногда определяются незначительно выраженные неврологические синдромы. Как правило, пациенты с 1-й стадией являются трудоспособными и при лечении своевременной терапии может наступить некоторый регресс неврологической симптоматики.

У пациентов с ДЭ 2-й стадии усугубляются когнитивные нарушения, становятся более выраженными неврологические синдромы, нередко теряется трудоспособность. При проведении компьютерной томографии или магнитно-резонансной томографии исследовании, а также при ультразвуковом доплерографическом обследовании брахиоцефальных и внутричерепных артерий и сосудов на этой стадии, как правило, определяются органические изменения в головном мозге. В клинической картине 2-й или 3-й стадии ДЭ часто у одного пациента определяется одновременно несколько синдромов: псевдобульбарный и когнитивный,

амиостатический и атактический, вестибуло-атактический и синкопальный. Наиболее часто с другими синдромами сочетается когнитивный. При 3-й стадии заболевания диагностируются выраженные когнитивные изменения, органическая неврологическая симптоматика, тазовые нарушения [2].

Патогенез сосудистых ишемических поражений головного мозга достаточно хорошо изучен [3]. В результате снижения уровня кислорода в артериальной крови, с одной стороны, и токсического воздействия недоокисленных продуктов (оксидантный стресс), с другой, нарастает комплекс патобиохимических расстройств. Это обуславливает развитие первичной и прогрессирование вторичной церебральной ишемии. Как известно, дефицит кислорода приводит к ограничению аэробного образования энергии вследствие нарушения энергосинтезирующей функции дыхательной цепи митохондрий. Изменение функций дыхательной цепи митохондрий вызывает нарушение процесса окислительного фосфорилирования. Одновременно с этим активизируется гликолиз, который является альтернативным окислительному фосфорилированию процессом. В результате происходит накопление активных форм кислорода (АФК), истощение запасов эндогенных антиоксидантов и активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к гибели клеток мозга [4].

Нарушение энергетического метаболизма, сопряженного с образованием АФК, приводит к изменению трансмембранных ионных потоков, накоплению внутриклеточного кальция и развитию глутамат-кальциевой эксайтотоксичности. Усиление свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса являются одними из важнейших патогенетических звеньев поражений центральной нервной системы.

В антиоксидантной системе защиты клеток от свободнорадикального окисления важнейшую роль играет фермент супероксиддисмутаза (СОД), который обеспечивает начальную фазу обезвреживания наиболее токсичных супероксидных анион-радикалов в реакции дисмутации с образованием перекисей водорода. Затем в реакции обезвреживания перекисей водорода участвует фермент каталаза.

Одним из методов коррекции нарушений, возникающих при ишемии головного мозга может быть лазерная гемотерапия в сочетании с лекарственными средствами, в частности внутривенное лазерное облучение крови (ВЛОК) в красной области спектра или надвенное лазерное облучение крови (НЛОК) в инфракрасной спектральной области, обладающие антиоксидантными, иммуномодулирующими, противовоспалительными свойствами [5, 6]. Адаптогенное действие низкоинтенсивного лазерного излучения реализуется на клеточном, тканевом, системном уровнях [6, 7]. Результатом действия лазерной гемотерапии, является ответ системы регулирования гомеостаза на развитие патологических процессов в отдельных органах и тканях, поэтому изучение действия различных длин волн низкоинтенсивного лазерного излучения при cerebrovasculary заболеваниях актуально.

В последнее время в медицинской диагностике становятся более актуальными методы исследования структур, образующихся при кристаллизации солей в биожидкостях. На практике для диагностики используется метод клиновидной дегидратации биожидкостей, разработанный Шабалиным В.Н. и Шатохиной С.Н. [8]. Кристаллы солей выпадают в виде зерен, образуют дендриты, а биологическая компонента жидкости создает сложную лепестковую структуру. Этот метод обладает неоспоримыми достоинствами для диагностики различных заболеваний человека на доклинической стадии.

При различных вариантах нарушения мозгового кровообращения, в частности ДЭ, высохшая капля биологической жидкости имеет отличную от здорового человека структуру [9-12].

В ряде работ на основе тщательного анализа высохшей капли БЖ пациентов различной патологии показаны особенности системной организации БЖ, выделены характерные структуры, которые могут служить маркерами не только уже проявившегося заболевания, но и свидетельствовать о самой начальной форме заболевания, когда симптомы заболевания еще практически отсутствуют. В последнее время разрабатываются алгоритмы распознавания конкретных видов маркеров, соответствующих физиологическому (нормальному) и патологическому состоянию организма, исследуется их эффективность [10-12].

Поскольку при патологических процессах происходит изменение фазового состояния белка, выявлены достаточно четкие зависимости типа «вид наблюдаемых структур - патологический процесс». И хотя в последнее время появилось множество работ, показывающих, что развитие самых разнообразных патологических процессов в организме сопровождается изменением распределения коллоидных частиц и солей БЖ, что сказывается на изменении морфоструктур высохших капель, до сих пор практически отсутствуют количественные оценки образующихся структур. На сегодняшний день нет модели, которая бы одновременно учитывала оба фактора.

В работах [9, 10] авторами проведен сравнительный анализ уровня нейроспецифических белков и показана возможность их использования в качестве дополнительного биохимического критерия поражения ГМ. Уделяется внимание особым изменениям в морфологической структуре фаций сыворотки крови больных с метастазами, что дополняет число маркеров патологических процессов различного типа [11, 12].

В настоящей работе для оценки процессов связывающей способности альбумина изучено пространственное распределение кальция в высохших каплях плазмы крови пациентов с ДЭ.

Нами ранее было показано, что изучение динамики структурирования БЖ и пространственного распределения жизненно необходимых элементов в высохшей капле плазмы крови дает возможность уточнять диагноз, оценивать результаты лечения пациентов с онкопатологией [13-15]. С этой же целью нами продолжены исследования структурирования высохших капель плазмы крови пациентов с ДЭ ГМ. Проведена также количественная оценка локального пространственного распределения кальция в высохшей капле.

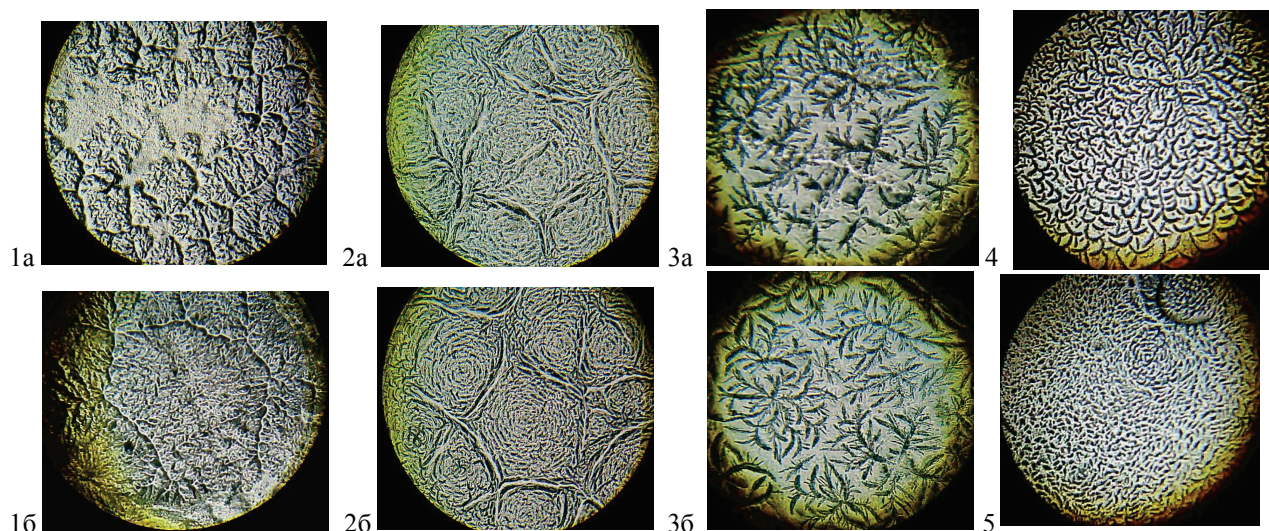


Рисунок 1. Снимки центральной части высохших капель плазмы крови пациентов: а – до лечения; б – после 8-10 сеансов ВЛОК (1, 3) и НЛОК (2)

Для изучения морфологии и пространственного распределения кальция в высохшей капле плазмы крови (10 мкл) наносили на обезжиренную пластинку из оргстекла, высушивали при комнатной температуре в открытой системе в течение 90 - 100 минут. Диаметр высохшей капли равен примерно 6 мм.

Снимки высохших капель плазмы крови регистрировали, используя оптический микроскоп Webbers, совмещенный с цифровой камерой (отраженный свет), и микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой. Оба микроскопа имеют видеонасадки, работающие с компьютером по USB-2 порту.

Изучена морфология высохших капель плазмы крови более 30 пациентов с ДЭ головного мозга различной степени и характером патологии. В качестве примера на рисунке 1 приведена морфология центральной части высохшей через 90 минут капли плазмы крови некоторых пациентов с ДЭ ГМ (увеличение 120 раз). 1 – Диагноз: Энцефалопатия сложного генеза 1 ст. Сопутствующий диагноз: ИБС. Атеросклеротический кардиосклероз аорты. Жалобы: Слабости в левых конечностях, боли в грудной клетке. 2 – Диагноз: Энцефалопатия сложного генеза 2 ст. с легким дрожательным гиперкинезом в руках. Дроп-атаки. Сопутствующий диагноз: ИБС, АГ 3, р.4. Постинфарктный и атеросклеротический кардиосклероз. 3 – Диагноз: Энцефалопатия 1 ст сложного генеза на фоне последствий ОНМК в 2017. Сопутствующий диагноз: ИБС. АГ 2, р.4. Жалобы: На приступы потемнения перед глазами, периодически сопровождающиеся потерей сознания длительностью около 5 минут, головная боль давящего характера в височных областях, шум в голове, нарушение равновесия при резких поворотах головы. 4 и 5 – доноры.

Видно, что при патологических состояниях организма характерны существенные изменения морфологической структуры фации. Проявляются нарушения в виде потери симметрии расположения основных элементов фации (конкреций, отдельностей, морщин, трещин и т. д.) [6-8]. Идентифицируются различные типы фаций, кроме радиального нормотипа.

Объемной структурной деформации наименее всего подвержены высохшие капли плазмы крови пациента 2, поверхность которых относительно гладкая, но с аномальным расположением трещин. Согласно имеющейся классификации, для этих больных характерен частично-радиальный и иррадиальный тип фации [12]. Присутствуют трехлучевые трещины (маркер застойных явлений в организме), небольшие жгуты (признак гипоксии ГМ) и бляшки (интоксикация организма) [12].

Структура фаций плазмы крови для всех изученных пациентов во многом схожа. Исключительно у больных с глубокой патологией (пациент 3) обильно присутствуют в фации морщины (скалчатость), хаотично разбросанные широкие жгутовые трещины, множество бляшек.

Морфотип фации пациента 1 отличается от потенциального здоровых людей (4 и 5). Присутствуют «токсические бляшки» и «морщины». У 3 пациента аномальное структурирование белка в значительной мере происходит в верхних слоях высыхающей капли плазмы крови. При этом на поверхности фации вытесняется NaCl, который кристаллизуясь, создает дендритную, похожую на листья, картину.

Наличие альбумина в крови в пределах физиологической нормы (45-55 % от общего белка) далеко не всегда отражает полноценность его транспортной функции. Его связывающие центры могут быть блокированы токсичными лигандами (при эндотоксемиях и печеночной недостаточности), в связи с чем ее транспортная емкость резко снижается. В связи с этим для клиницистов весьма важное значение имеет методика определения степени заблокированности центров связывания альбумина, его резервной связывающей способности и в соответствии с этим оценки транспортной функции.

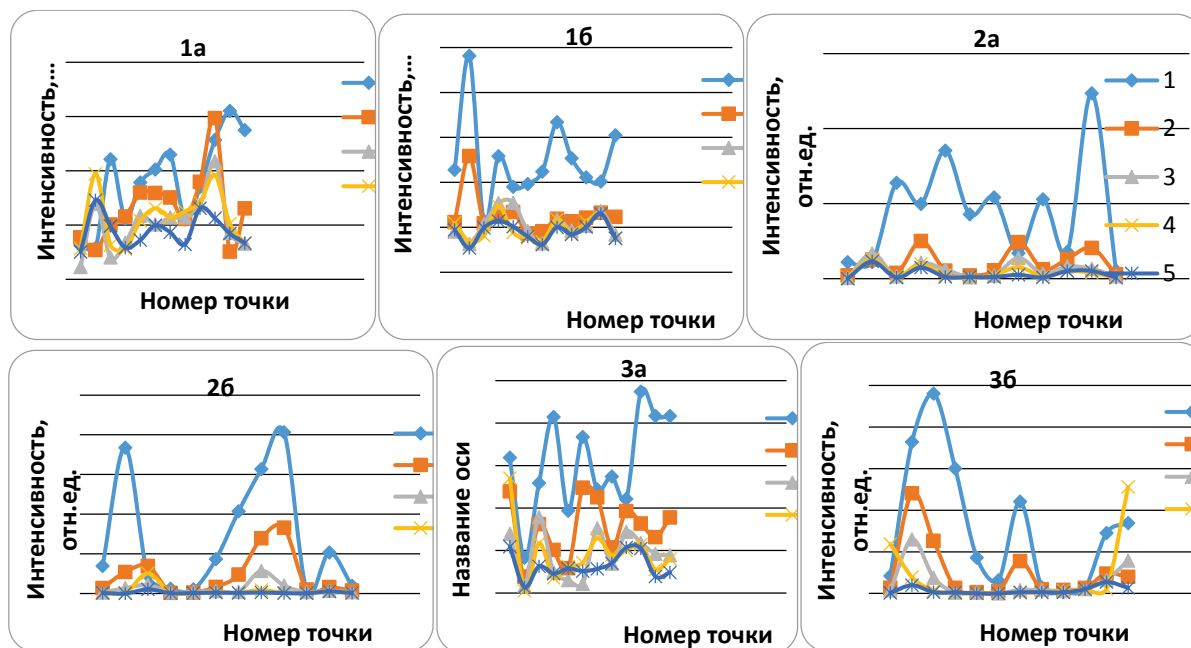


Рисунок 2. Интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в атомно-эмиссионных спектрах фаций плазмы крови пациентов. В столбце справа – номер слоя

Для конкретизации патологии обследованных больных дополнительная информация получена при определении кальция с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии (ЛАЭМС). Количественную оценку локального пространственного распределения кальция по поверхности и объему всей высохшей капли проводили с помощью лазерного многоканального атомно-эмиссионного спектрометра LSS-1. Акцент сделан на определение кальция, поскольку он не только «спектроскопически доступен», но и является одним из самых необходимых элементов в организме, наиболее активным коацерватом в белковой среде, легко образует связи с амино- и карбоксильными группами белковых молекул, что определяет картину структурирования БЖ.

Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 104 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали результаты действия каждого из 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ) на точку. Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы, соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

Результаты полуколичественного определения пространственного распределения кальция в высохших каплях плазмы крови пациентов до (1а, 2а и 3а) и после (1б, 2б, 3б) облучения крови методами НЛОК (2) и ВЛОК (1 и 3) приведены на рисунке 2. Приведены интенсивности линии кальция Ca II (393,366 нм) измененные по диаметру на поверхности высохшей капли, а также при послойном определении (5 слоев) в каждой анализируемой точке.

Для здорового человека характерно уже хорошо изученное равномерное распределение кальция по поверхности высохшей капли с максимальной концентрацией в краевом белковом валике благодаря равномерной диффузии раствора к краям в процессе испарения [12-14]. При патологии изменение связывающей способности альбумина приводит к аномальной коагуляции белка и увеличению концентрации кальция по центру фации в более глубоких слоях.

Полученные данные показывают, что у больных с ДЭ в процессе высыхания капель плазмы происходит хаотичное образование центров коагуляции, наблюдается разброс концентрации кальция как по поверхности, так и слоям. Налицо - изменение связывающей способности альбумина при патологии. Это приводит к аномальной коагуляции белка и увеличению концентрации кальция по центру фации и в более глубоких слоях, что не характерно для здорового человека. После проведения 8-10 сеансов облучения крови НЛОК (2) и ВЛОК (1 и 3) пациентов наблюдаются определенные улучшения свойств белков плазмы крови – максимальное распределение кальция передвигается на периферию капли, что ближе к качеству белков здорового человека.

При сравнении графиков, приведенных на рисунке 2, для больного 2 наблюдается значительно большая общая концентрация кальция, чем для пациентов 1 и 3. Следует подчеркнуть, что у него морфология фации плазмы крови ближе к морфологии здоровых людей.

Изучение взаимосвязи между состоянием организма и изменением содержания жизненно необходимых элементов (ЖНЭ) при патологии является требованием сегодняшнего дня современной медицины.

Исследования по определению общего количественного содержания ЖНЭ в биосредах проводили на экспериментальной установке ЭМАС 200Д (пр-во ЗАО «Спектроскопические системы» Минск, Беларусь) [16]. Спектрометр состоит из трех основных элементов: источника возбуждения спектра, спектрального прибора и регистрирующей части. Анализируемое вещество, помещенное на держатель, дугой переменного тока переводится в парообразное состояние и возбуждается свечение его паров. Излучение направляется в спектральный прибор, который пространственно разделяет монохроматические составляющие и располагает их в упорядоченную систему по длинам волн. В данной установке используется монохроматор МДР-23, работающий в режиме полихроматора, производящий разложение анализируемого излучения в спектр и проектирующий участок спектра в спектральном интервале 34 нм на детектор. В качестве приемника излучения используется ОМА – оптический многоканальный анализатор. Источником возбуждения спектров служит универсальный генератор UBI-1. Он позволяет в ходе проводимых экспериментов менять режимы дуги переменного тока для подбора условий, обеспечивающих наилучшую воспроизводимость интенсивностей спектральных линий.

Образцы помещают в универсальный штатив (УШТ-4) генератора, верхним электродом служит обычный угольный электрод с усеченным конусом, нижним — угольный электрод с углублением для помещения образца. Штатив оборудован системой теплоотвода.

Управление режимом регистрации и вывод информации об исследуемом спектре производится персональной ЭВМ, данные выводятся на принтер. Такая база спектрометра, наличие программного обеспечения дает возможность определения не менее восьмидесяти элементов в анализируемом объекте. Проводится математическая обработка результатов анализа.

Высокая чувствительность, воспроизводимость, значительно меньшая трудоемкость подготовки проб позволила нам остановиться на выборе анализа небольших количеств сухого остатка биологических субстратов на электроде. Уголь и графит являются наиболее подходящими материалами для изготовления электродов: они легко обрабатываются механически, имеют высокую степень чистоты и обладают спектром с малым числом линий. Углерод, из-за его высокого потенциала ионизации и высокой температуры сублимации, способствует образованию высокотемпературной плазмы. В работе использованы специальные спектральные угольные стержни диаметром 6 мм, марки ОСЧ 7-3.

Здесь следует отметить, что при использовании угольных электродов их довольно большая пористость ограничивает возможность повышения чувствительности анализа. При большом количестве выпариваемого раствора он проникает в электрод на значительную глубину и для полного испарения пробы необходимо значительное нагревание электрода и длительная экспозиция при регистрации спектра. Для ослабления этого фактора объем раствора проб был выбран таким, чтобы процесс сушки был недолгим и не требовал высокой температуры. Экспериментально было установлено, что 20-25 мкл раствора обеспечивает требуемую чувствительность и хорошую воспроизводимость анализа.

Важно так же подчеркнуть, что количественный атомно-эмиссионный спектральный анализ является относительным методом, а поскольку биологические объекты очень разнородны по содержанию макро- и микроэлементов, особое внимание уделялось разработке и изготовлению стандартных образцов, адекватных по составу исследуемым образцам.

При анализе жидкой фракции образца на верхнюю поверхность нижнего электрода с цилиндрическим углублением диаметром 4 мм с помощью микропипетки наносили точное количество раствора (20 мкл), подсушивали теплом настольной лампы 100 Вт до полного высыхания жидкости с поверхности электродов. Для проведения экспериментов использовали дугу переменного тока ($I = 6$ А), так как при этом токе наблюдается наиболее равномерное уменьшение интенсивности от времени возбуждения. Ширина щели – 40 мкм, время накопления одного спектра – 0,6 с, число накоплений – 25, общее время накопления – 15 с.

Анализ полученных результатов показал значительное повышение содержания алюминия, железа, кальция, цинка у всех пациентов как до, так и после оперативного вмешательства. Из полученных данных можно отметить, как и выше это отмечалось, содержание кальция у пациента 2 почти в 3 раза выше, чем у пациентов 1 и 3.

Для всех пациентов наблюдается небольшой дефицит магния. В последнее время возросло количество исследований, посвященных установлению нейротрофического эффекта магния – участия его в процессах

Таблица 1. Содержание ЖНЭ в образцах плазмы крови пациентов (мкг/100 г)

Пациент	Al	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn
1 до	32	1365	12437	211	136	151
1 после	19	1475	15367	240	111	124
2 до	60	1566	46929	243	83	140
2 после	43	1669	42296	411	174	166
3 до	24	1608	17248	263	152	160
3 после	40	1646	18503	186	48	214
Референтные значения						
Нижний уровень	0	1600	8800	36	69	90
Верхний уровень	6	2500	10400	144	142	120

клеточного роста нейронов, опосредуемого различными нейротрофическими факторами: мозговым нейротрофическим фактором, фактором роста нервов, нейротрофином 3 и др. [7, 14].

В последнее время многочисленные исследования посвящены изучению роли ионов кальция в клетках в качестве сигнальной молекулы. Ca^{2+} способен выполнять функции первичного, вторичного и даже третичного посредника, т.е. управлять генерацией и регуляцией информации, в том числе и собственной [1-5].

Оптимальный уровень свободного Ca^{2+} внутри клетки составляет 100-200 нМ, однако возможны значительные колебания этого уровня в цитозоле, но лишь в течение непродолжительного времени. Одним из механизмов, регулирующим кальциевую перегрузку клеток является возможность захвата больших количеств Ca^{2+} митохондриями и депонирования его в виде нерастворимой фосфорнокислой соли – гидроксиапатита. Так как процесс этот сопряжен с энергозатратами, то происходит уменьшение или прекращение синтеза АТФ, необходимого для удаления Ca^{2+} из цитоплазмы [3]. Энергодефицит при ИИ приводит к некрозу мозговой ткани и ускоренному апоптозу в зоне пенумбры, т.к. апоптоз опосредуется рядом протеаз и каспаз, активируемыми ферментами, которые регулируются ионами кальция [3].

Известно, что повышенное высвобождение кальция способствует ишемическому повреждению нейронов вследствие вазоконстрикции и инициации каскада апоптоза [3, 7]. Кальций катализирует также многочисленные биохимические процессы в нейронах и участвует в пластичности нервных сетей. С обменом этого биоэлемента тесно связано функционирование многочисленных белков и ферментов, а также синергические и антагонистические отношения с микроэлементами. Конкурентные взаимоотношения между различными металлами (цинк, медь, кадмий) и кальцием могут определять самые разнообразные биологические эффекты и, в конечном счете, – течение многих неврологических заболеваний, в т.ч. ишемического генеза [12].

Таким образом, анализ содержания химических элементов в плазме крови у пациентов с ДЭ позволил выявить особенности микроэлементных изменений в организме, что влечет за собой нарушения протекания многих биохимических и физиологических реакций при гипоксическом повреждении головного мозга. Установлено статистически значимое одностороннее снижение суммарного уровня магния в плазме крови. Показано достоверное превышение нормальных значений суммарного содержания для алюминия, кальция, железа и цинка. Наблюдаемые изменения концентрации элементов, морфоструктуры высохшей капли, пространственного распределения кальция могут быть фармакологическим ответом на воздействие назначаемых в процессе лечения препаратов и определять эффективность терапевтического лечения после сеансов НЛОК и ВЛОК. Выявленные микроэлементозы могут влиять на особенности клинического течения заболевания и обосновывают целесообразность дополнения терапии медикаментозными комплексами для коррекции минерального обмена.

Список литературы / References:

1. Гусев Е.И. Семакс в профилактике прогрессирования и развития обострений у больных с дисциркуляторной энцефалопатией. *Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова*, 2005, № 2, с. 35-39. [Gusev, E.I. Semax in the prevention of progression and development of exacerbations in patients with dis-circulatory encephalopathy. *Journal of neurology and psychiatry. Korsakov*, 2005, no. 2, pp. 35-39. (In Russ.)]
2. Левин О.С. Неврология. *Справочник практического врача*. М.: «МЕДпресс-информ», 2016, изд. 10, с. 406-416. [Levin O.S. Neurology. *Handbook of the practical doctor*. М.: "Medpress-inform", 2016, ed. 10, pp. 406-416. (In Russ.)]
3. Нечипуренко Н.И. Роль кислородзависимых процессов в патогенезе хронической ишемии головного мозга. *Неврология и нейрохирургия*, 2012, № 3, с. 150-159. [Nechipurenko N.I. the Role of oxygen-dependent processes in the pathogenesis of chronic brain ischemia. *Neurology and neurosurgery*, 2012, no. 3, pp. 150-159. (In Russ.)]
4. Chen S.D. et al. Roles of oxidative stress, apoptosis, PCG-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12 no. 10, p. 7199.
5. Гейниц А.В., Москвин С.В., Азизов Г.А. *Внутривенное лазерное облучение крови*, 2006, 144 с. [Geynits A.V., Moskvina S.V., Azizov G.A. *Intravenous laser irradiation of blood*, 2006, 144 p. (In Russ.)]
6. Нечипуренко Н.И. *Лазерная гемотерапия при ишемических цереброваскулярных заболеваниях (экспериментальные и клинические аспекты)*, Минск: Бизнесофсет, 2010, 192 с. [Nechipurenko N.I. *Laser hemotherapy for ischemic cerebrovascular diseases (experimental and clinical aspects)*, Minsk: Biznesofset, 2010, 192 p. (In Russ.)]
7. Пашковская И.Д., Нечипуренко Н.И., Василевская Л.А. Эффекты инфракрасного лазерного излучения при экспериментальной церебральной ишемии. *Здравоохранение*, 2010, № 2, с. 74-78. [Pashkovskaya I.D., Nechipurenko N.I., Vasilevskaya L.A. Effects of infrared laser radiation in experimental costal ischemia. *Health Care*, 2010, no. 2, pp. 74-78. (In Russ.)]
8. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. *Морфология биологических жидкостей человека*. М.: Хризостом, 2001, 302 с. [Shabalin V.N., Shato-Hina S.N. *Morphology of human biological fluids*. Moscow: Chrysostom, 2001, 302 p. (In Russ.)]
9. Булойчик Ж.И. Морфологическое и спектрофотометрическое исследование плазмы крови пациентов с аневризмой сосудов головного мозга. *Журнал БГУ. Физика*, 2018, № 1, с. 9-17. [Buloychik Zh.I. Morphological and spectrophotometric study of blood plasma of patients with cerebral aneurysm. *Journal of BSU. Physics*, 2018, № 1, pp. 9-17. (In Russ.)]

10. Максимов С.А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*, 2007, № 4, с. 80-85. [Maksimov S.A. Morphology of the solid phase of biological fluids as a diagnostic method in medicine. *Siberian Medical Bulletin*, 2004, № 4, pp. 80-85. (In Russ.)]
11. Краевой С.А., Колтовой Н.А. Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей. *Открытая капля*, 2013, с. 67-71. [Kraevoy S.A., Koltovoy N.A. Diagnosis on the basis of one blood drop. Crystallization of biological fluids. *Open drop*, 2013, pp. 67-71. (In Russ.)]
12. Сидоренко Ю.С., Шихлярова А.И., Сергостьянц Г.З. Региональные особенности морфологии крови больных раком легкого: процессы самоорганизации в динамике хирургического лечения и аутогемотрансфузии. *Вестник южного научного центра РАН*, 2005, т. 1, № 4, с. 64-71. [Sidorenko Yu.S., Shikhlyarova A.I., Segostjantz G.Z. Regional features in blood morphology of the patients with cancer of lung: the self-organization processes in dynamics of surgery and autohemotransfusion. *J. of the Southern Research Center of RAS*, 2005, vol. 1, no. 4, pp. 64-71. (In Russ.)]
13. Булойчик Ж.И., Веремчук А.Н., Русско Т.А., Маслова Г.Т., Мавричев А.С. Морфологическое и спектрометрическое изучение образцов высохших капель крови онкологических больных. *Вестник БГУ*, 2015, сер. 1, № 2, с. 24-30. [Buloichik J.I., Veremchuk A.N., Russko T.A., Maslova G.T., Mavrichev A.S. Morphological and spectrometric studies of the dried blood-drop samples of oncological patients. *J. of BSU*, 2015, iss. 1, no. 2, pp. 24-30. (In Russ.)]
14. Савков А.В., Сергей М.А., Булойчик Ж.И., Маслова Г.Т., Мавричев А.С., Державец Л.А. Использование морфоструктурного анализа и лазерной атомно-эмиссионной спектрометрии высохших капель плазмы крови для диагностики рака простаты. *Вестник БГУ*, 2016, сер. 1, № 3, с. 51-62. [Savkov A.V., Sergei M.A., Buoichik J.I., Maslova G.T., Mavrichev A.S. The use of morphostructural analysis and laser atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops for diagnosis of prostate carcinoma. *Vestnik BGU*, 2016, iss. 1, no. 3, pp. 51-62. (In Russ.)]
15. Булойчик Ж.И., Маслова Г.Т., Корзук В.В., Сергей М.А., Мавричев А.С., Державец Л.А. Применение атомно-эмиссионной спектрометрии высохших капель плазмы крови в диагностике и лечении опухолей мозга. *Ж. Белгосуниверситета, физика*, 2017, № 2, с. 17-26. [Buloichik J.I., Maslova G.T., Sergey M.A., Korzuk V.V., Mavrichev A.S., Derzhavets L.A. Using of atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops in diagnosis and treatment of brain tumors. *J. of BSU. Physics*, 2017, no. 2, pp. 17-26. (In Russ.)]
16. Дидковский Я.И., Коваленко М.Н., Минько А.А., Последович М.Р. Разработка и применение спектральных приборов с многоканальными фотоприемными устройствами. *Вестник БГУ*, 2013, сер. 1, № 3, с. 20-24. [Didkovsky Ya.I., Kovalenko M.N., Minko A.A., Posledovich M.R. Development and application of spectral devices with multichannel photodetector devices, *Bulletin of BSU*, 2013, iss. 1, no. 3 pp. 20-24. (In Russ.)]

ASSESSMENT OF THE DYNAMICS OF VNE METABOLISM IN PATIENTS WITH BRAIN DISEASES USING ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY OF BLOOD PLASMA SAMPLES

Prokopenko T.A., Nechipurenko N.I.¹, Kovalenko M.N.², Pashkovskaya I.D.¹, Patapovich M.P.², Zajogin A.P.²,

¹ Republican Research-Practical Center of Neurology and Neurosurgery
24 F. Skoryny Street, Minsk, 220114, Belarus; e-mail: zajogin_an@mail.ru

² Belorussian State University
4 Nezalieznasci Avenue, Minsk, 220030, Belarus

Abstract. The morphology of dried blood plasma samples from patients with dyscirculatory encephalopathy (DE) of the brain was studied. The structural features of dried blood plasma drops of patients diagnosed with various degrees of brain DE were revealed before and after intravenous and intravenous laser irradiation of blood. It is shown that it is possible to clarify the diagnosis by assigning the tumor to different types. Semi-quantitative results of spatial distribution of calcium on the surface of a dried drop of biological liquids and in layers using the method of laser atomic emission spectrometry were obtained. It is shown that the method of laser atomic emission spectrometry makes it possible to quantify changes in protein centers and is an operational highly sensitive tool in the diagnosis of diseases. The analysis of blood plasma samples was performed using atomic emission multichannel spectrometry. An integral assessment of the metabolism of vital elements (VNE) is given. A significant increased content of aluminum, iron, calcium, zinc and reduced magnesium was found in all patients both before and after surgery. The identified microelementoses can affect the features of the clinical course of the disease and justify the expediency of supplementing therapy with medication complexes for the correction of mineral metabolism. The obtained experimental data can be the basis for further development of the methodology for early diagnosis of violations of the level of functional reserves of the body and the development of a system of rehabilitation measures.

Key words: atomic-emission spectral analysis, blood plasma, biological fluids, drop morphology, laser atomic-emission spectrometry, spatial distribution of calcium, layer-by-layer analysis.

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПОЯСНИЧНОМ УТОЛЩЕНИИ СПИННОГО МОЗГА И СЕДАЛИЩНОМ НЕРВЕ МЫШИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОГРАВИТАЦИИ

Шаймарданова Г.Ф.^{1,2}, Гайсин И.А.², Васильева А.Р.², Краснова Л.А.²

¹ Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: gulnara-f-kzn@mail.ru

² ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России
ул. Бутлерова, 49, г. Казань, 420012, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. В работе дана характеристика транскрипционной активности генов *dlg4*, *mpz*, *anxa5*, *agrn*, *chat* в мотонейронах поясничного утолщения спинного мозга и седалищном нерве мышцы в условиях длительного (30 сут.) антиортостатического вывешивания в сравнении с контрольной группой, находившейся в обычных условиях вивария. Соответствующие белки играют важную роль в обеспечении структуры и проводимости периферического нерва. Выбранные гены, согласно результатам предыдущих исследований, увеличили уровень активности после 30-суточного пребывания в космосе. Организация модельного эксперимента на Земле позволила проследить динамику изменений в зависимости от длительности вывешивания, а также сравнить их проявления в нейронах поясничного утолщения спинного мозга и в седалищном нерве. По нашим данным, выделяется приблизительно двухнедельный период, в течение которого система пытается функционировать без радикальных перестроек своего метаболизма. По истечении этого периода включаются адаптационные механизмы, выражающиеся в резкой активации указанных генов (за исключением *mpz*).

Ключевые слова: антиортостатическое вывешивание, экспрессия генов, седалищный нерв.

Космический полет – одна из самых стрессовых ситуаций, с которыми сталкивается человек. В космосе человек подвержен радиации, гипогравитации, гиподинамии, испытывает изоляцию, оксигенацию, что нарушает систему гомеостаза и оказывает неблагоприятное воздействие на большинство функций организма. В результате воздействия невесомости формируется гипогравитационный двигательный синдром (ГДС), который включает в себя нарушения сенсорных систем, двигательных функций, функции мышц, гемодинамики. Но если мышечный аспект ГДС исследован всесторонне и подробно, то изменения в центральной и периферической нервных системах изучены недостаточно [1]. Первые исследования морфологии аксонов седалищного нерва мышцы в условиях разгрузки задних конечностей появились только в 2009 году [2]. Лишь относительно недавно получены существенные свидетельства того, что центральная нервная система играет ключевую роль в запуске и развитии ГДС [3, 4]. Однако конкретные механизмы этого влияния и источники адаптивных реакций со стороны периферической нервной системы остаются неясными. Имеющиеся данные показывают, что нарушения движений, силы и точности мышечных сокращений связаны с нарушениями «мышечного чувства» – ощущения положения частей собственного тела относительно друг друга и в пространстве, что указывает на вовлеченность в ГДС сенсорных нейронов. Информационные межклеточные взаимодействия в системе мотонейрон – скелетная мышца регулируют активность различных генов, определяющих морфофункциональные особенности обоих клеточных партнеров. Импульсная активность мотонейронов и нейрогенных молекул, секретируемых нервным окончанием, контролирует экспрессию генов в волокнах скелетных мышц. Мышцы, в свою очередь, синтезируют миогенные нейротрофические факторы, которые транспортируются в перикарион и стимулируют экспрессию определенных специфических генов в нервных клетках [5, 6]. Учитывая, что мРНК синтезируются в перикарионе мотонейрона, а затем через механизмы антероградного транспорта аксонов, распределенных по длине волокна, транспортируются в нервные окончания, можно предполагать, что изменения активности транскрипции мРНК и ее доставки в сайт трансляции могут быть патогенетическими звеньями ГДС.

В работе исследовали уровень транскрипционной активности генов *dlg4* (PSD95), *mpz* (P0), *anxa5* (Annexin V), *agrn* (Agrin), *chat* (Choline acetyltransferase) в поясничном утолщении спинного мозга и в смешанной ветви седалищного нерва мышцей опытной и контрольной групп на разных сроках антиортостатического вывешивания. Соответствующие белки играют важную роль в обеспечении структуры и проводимости периферического нерва. Организация эксперимента позволила проследить динамику изменений в зависимости от длительности вывешивания, а также дифференцировать эти проявления в зависимости от локализации в нейрональной или аксональной частях седалищного нерва.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на белых мышках самцах массой 25 ± 3 г ($n = 36$). Все процедуры с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского Национального комитета по биоэтике.

Животные были разделены на две группы: контрольную ($n = 9$) и опытную ($n = 27$). У животных подопытной группы моделировали гипогравитацию методом антиортостатического вывешивания задних конечностей [7]. Животных контрольной группы содержали в стандартных условиях вивария. Через определенные промежутки времени (3, 14, 21, 30 сут.) по три животных наркотизировали, перфузировали 4% раствором параформальдегида (рН 7,4). Для исследования выделяли седалищные нервы на уровне верхней трети бедра (большеберцовая и кожная ветви) и участок спинного мозга, соответствующий поясничному утолщению.

Расчет относительного уровня экспрессии целевых генов проводили на основе результатов ПЦР в реальном времени. Количественное содержание кДНК, соответствующей транскриптам целевых и референсных генов, оценивали в относительных единицах, сопоставляя значения порогового цикла реакции (C_t) для каждого образца с калибровочной кривой. Калибровочную кривую, отражающую зависимость увеличения значения порогового цикла реакции от уменьшения исходной концентрации ДНКмишени, строили на основании результатов ПЦР-реакций, в которых в качестве матрицы использовали серию разведений (1-, 10-, 100-, 1000 кратных) смеси образцов кДНК. Каждую реакцию проводили в двух аналитических повторностях. Определение уровня экспрессии целевых генов проводили относительно референсных генов *gapdh* и *rpl13a* (все значения даны в относительных единицах). При этом относительные значения количественного содержания кДНК, соответствующей транскриптам референсных генов, использовали для вычисления фактора нормализации. Фактор нормализации рассчитывали с помощью формулы $(P1 \cdot P2)^{(1/2)}$, где $P1$ и $P2$ значения содержания транскриптов первого и второго референса соответственно. За уровень экспрессии принимали частное двух значений: 1) количественного содержания кДНК, соответствующей транскриптам целевого гена, и 2) фактора нормализации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование имело целью сравнить экспрессию целевых генов в динамике при моделировании гипогравитации на Земле. Для этого измеряли транскрипционную активность генов *dlg4* (PSD95), *mpz* (P0), *anx5* (Annexin V), *agrn* (Agrin), *chat* (Choline acetyltransferase) в поясничном утолщении спинного мозга и седалищном нерве мышей на различных сроках антиортостатического вывешивания. Выбранные гены, согласно результатам транскриптомного анализа спинного мозга [8], увеличили уровень активности после 30-суточного пребывания в космосе.

Результаты анализа транскрипционной активности целевых генов в поясничном утолщении спинного мозга мышей на различных сроках вывешивания приведены на рисунке 1а. Обращает на себя внимание немономотное поведение уровня экспрессии указанных генов. По сравнению с контрольной группой в первые две недели вывешивания имеется тенденция к уменьшению экспрессии некоторых генов. В частности, на 14-е сутки достоверно зафиксировано падение экспрессии генов, кодирующих XAT, PSD95 и белок миелина P0. На более длительных сроках наблюдается рост экспрессии большинства исследованных генов, за исключением *mpz* (P0), экспрессия которого осталась на низком уровне в пределах точности определения. Наиболее сильно возросла экспрессия *dlg4* (PSD95), *anx5* (аннексин V) и *agrn* (агрин).

При исследовании образцов седалищного нерва, характер изменения транскрипционной активности генов *mpz*, *dlg4* и *anx5* от времени эксперимента, в целом, оказался сходен с наблюдаемым в спинном мозге (Рисунок 1б). Зафиксировано устойчивое снижение активности генов *mpz* наряду с ростом активности *dlg4* (PSD95) и *anx5* (Annexin V) после двух недель вывешивания.

Белок PSD95 является скаффолдным белком, организующим пространственную структуру и активирующем работу каналобразующих белков и рецепторов. В периферическом нерве PSD95 распространен не только в постсинаптической области, но и на всем протяжении аксональной части седалищного нерва [9], где участвует в регуляции активности глутаматных рецепторов. Аннексин V участвует в экзо- и эндоцитозе, регуляции

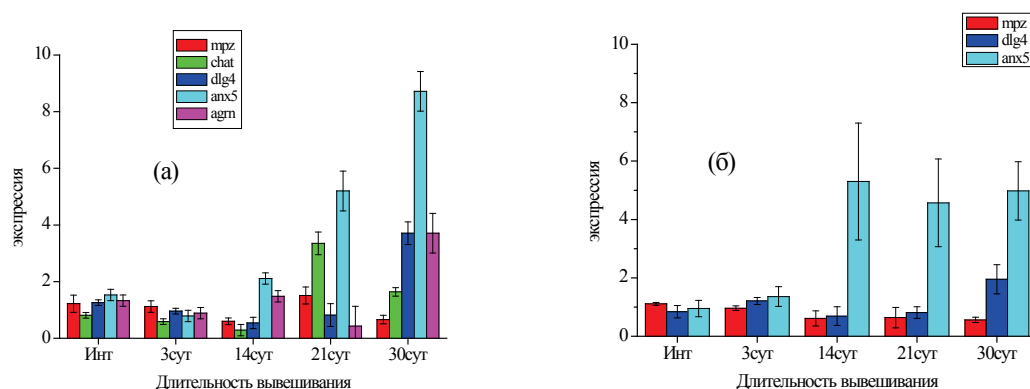


Рисунок 1. Уровень транскрипционной активности генов в (а) поясничном утолщении спинного мозга и (б) большеберцовой ветви седалищного нерва в мышей на различных сроках вывешивания по отношению к контролю

кальциевых каналов, сигнальных путях, воспалении, росте и дифференцировке клеток и апоптозе, в том числе в нейронах [10]. Агрин играет роль организатора синаптических контактов, участвует в регуляции воспалительных процессов, связываясь с рецепторами глутамата [11]. Кроме того, в волокнах седалищного нерва аннексин V и агрин локализованы на миелиновых оболочках, что указывает на возможную роль этих белков в функционировании миелина [12]. Рост транскрипционной активности этих генов на поздних сроках вывешивания может свидетельствовать об активации патологического процесса, о чем также свидетельствуют морфологические изменения нервных волокон [13].

В седалищном нерве мы не обнаружили достоверной амплификации генов *chat* и *agrn*. Причиной могут быть как отсутствие этих мРНК в волокнах седалищного нерва, так и погрешности, связанные с малым количеством ткани на фоне низкой экспрессии.

Исследование экспрессии генов в условиях невесомости является одной из ключевых задач для установления механизмов нарушений функционирования различных систем организма человека. Ранее при моделировании последствий гипогравитации на Земле у мышей [14] на 30-е сутки было показано подавление экспрессии 38 генов в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга, кодирующих миелинообразующие белки, белки каналов и насосов, ответственных за электрогенные свойства мембраны нервных клеток, снижение иммуноэкспрессии белков, принимающих участие в процессах синаптической передачи возбуждения: синаптофизина и PSD95, а также белков теплового шока Hsp25 и Hsp70.

В аналогичном исследовании после 30-суточного космического полета [15-17] 134 гена показали достоверное увеличение и 41 ген - достоверное снижение экспрессии в материале поясничного отдела спинного мозга мышей. При этом спектр генов с измененной экспрессией в условиях реальной и моделируемой гипогравитации оказался разным, что указывает на различия в патогенезе ГДС, несмотря на сходство локомоторных нарушений.

В недавно опубликованной работе [8] проведен транскриптомный анализ в образцах седалищного нерва из того же полетного материала. Исследование выявило значительный пул генов (87), экспрессия которых увеличилась более чем в 32 раза при сравнении с мышами из контрольной группы. Изменилась экспрессия генов, имеющих отношение к состоянию метаболических и сигнальных путей, регуляции актинового цитоскелета, потенциал-зависимых кальциевых, натриевых и калиевых каналов, миелинизации нервных волокон.

Методы транскриптомного анализа позволяют охватить в целом обширную картину взаимодействия сигнальных и метаболических путей, вовлеченных в ГДС. Тем не менее, для изучения количественных соотношений и их динамики лучше приспособлены методы «ручного» ПЦР и иммуногистохимии. Результаты настоящей работы подтвердили, что на 30-е сутки антиортостатического вывешивания происходит активация генов *dlg4*, *анха5*, *agrn*, *chat*, играющих важную роль в обеспечении структуры и проводимости периферического нерва. Организация эксперимента позволила также проследить динамику изменений в зависимости от длительности вывешивания, а также дифференцировать эти проявления в зависимости от локализации в мотонейронах поясничного отдела спинного мозга либо в седалищном нерве. По нашим данным, изменение активности выбранных генов происходит качественно сходным образом в мотонейронах спинного мозга и в седалищном нерве. Выделяется приблизительно двухнедельный период, в течение которого система пытается функционировать без радикальных перестроек своего метаболизма. По истечении этого периода включаются адаптационные механизмы, выражающиеся в резкой активации указанных генов, за исключением *mpz* (P0), активность которого демонстрирует устойчивое снижение.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-01404).

Список литературы / References:

1. Цыбко А.С., Ильчибаева Т.В., Попова Н.К. Влияние космического полета на экспрессию генов в головном мозге экспериментальных животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2016, т. 20, № 2, с. 172-179. DOI: 10.18699/VJ16.134. [Cybko A.S., Il'chibaeva T.V., Popova N.K. Vliyanie kosmicheskogo poleta na ekspressiyu genov v golovnom mozge eksperimental'nyh zhivotnyh. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*, 2016, vol. 20, no. 2, pp. 172-179. (In Russ.)]
2. Canu M.-H., Carnaud M., Picquet F., Goutebroze L. Activity-dependent regulation of myelin maintenance in the adult rat. *Brain Research*, 2009, vol. 3, pp. 45-51.
3. Islamov R.R., Tyapkina O.V., Nikol'skii E.E., Kozlovskaya I.B., Grigor'ev A.I. The Role of Spinal Cord Motoneurons in the Mechanisms of Development of Low-Gravity Motor Syndrome. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2015, vol. 45, no. 1, pp. 96-103. DOI: 10.1007/s11055-014-0045-9.
4. Nagatomo F., Terada M., Ishioka N., Ishihara A. Effects of Exposure to Microgravity on Neuromuscular Systems: A Review. *Int. J. Microgravity Sci. Appl.*, 2014, vol. 31, no. 2, pp. 66-71.
5. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, 2004, т. 5, с. 508-521. [Grigor'ev A.I., Kozlovskaya I.B., SHenkman B.S. Rol' opornoj afferentacii v organizacii tonicheskoy myshechnoj sistemy. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2004, vol. 5, pp. 508-521. (In Russ.)]
6. Baguma-Nibasheka M., Fracassi A., Costain W. et al. Role of skeletal muscle in motor neuron development. *Histol. Histopathol.*, 2016, vol. 31, no. 7, pp. 699-719. DOI 10.14670/HH-11-742.

7. Morey-Holton, E.R., Globus, K., Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.*, 2002, vol. 92, pp. 1367-77. DOI: 10.1152/japplphysiol.00969.2001.
8. Kuznetsov M.S., Rezvyakov P.N., Lisyukov A.N., Gusev O.A., Nikolskiy E.E., Islamov R.R. Bioinformatic Analysis of the Sciatic Nerve Transcriptomes of Mice after 30-Day Spaceflight on Board the Bion-M1 Biosatellite. *Russian Journal of Genetics*, 2019, vol. 55, no. 3, pp. 388-392. DOI: 10.1134/S1022795419030104.
9. Chen T.-J., Kukley M. Glutamate receptors and glutamatergic signalling in the peripheral nerves. *Neural Regen. Res.*, 2020, vol. 15, no. 3, pp. 438-447. DOI: 10.4103/1673-5374.266047.
10. Bouter A., Carmeille R., Gounou C., Bouvet F., Degrelle S.A., Evain-Brion D., Brisson A.R. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta 36, Supplement 1, Trophoblast Research*, 2015, vol. 29, pp. S43-S49. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.01.193.
11. Bolliger M.F., Zurlinden A., Lüscher D., Bütikofer L., Shakhova O., Francolini M., et al. Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction. *J. Cell Sci.*, 2010, vol. 123, pp. 3944-3955. DOI: 10.1242/jcs.072090.
12. Shaymardanova G.F., Salnikov V.V. Localization of Annexin V and Agrin in the Intact Sciatic Nerve of Mice. *Neurochemical Journal*, 2020, vol. 3 (in press).
13. Rezvyakov P.N., Shaimardanova G.F., Lisukov A.N., Kuznetsov M.S., Islamov R.R., Nikolskiy E.E. Morphological Study of Myelinated Fibers of the Sciatic Nerve in Mice after Space Flight and Readaptation to the Conditions of Earth Gravity. *Doklady Biological Sciences*, 2018, p. 482. DOI: 10.1134/S0012496618050101.
14. Islamov R.R., Rizvanov A.A., Tyapkina O.V., Shenhman B.S., Kozlovskaya I.B., Nikolskiy E.E., Grigoryev A.I. Genomic Study of Gene Expression in the Mouse Lumbar Spinal Cord under the Conditions of Simulated Microgravity. *Doklady Biological Sciences*, 2011, vol. 439, pp. 197-200. DOI: 10.1134/S0012496611040107.
15. Islamov R.R., Gusev O.A., Tanabe A., Terada M., Tyapkina O.V., Petrov K.A., Rizvanov A.A., Kozlovskaya I.B., Nikolskiy E.E., Grigorjev A.I. Genomic Analysis of Mouse Lumbar Spinal Cord after 30 Day Space Flight on Biosatellite Bion-M1. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2014, vol. 458, pp. 177-178. DOI: 10.1134/S1607672914050068.
16. Islamov R.R., Gusev O.A., Tanabe A., Terada M., Tyapkina O.V., Petrov K.A., Rizvanov A.A., Kozlovskaya I.B., Nikolskiy E.E., Grigorjev A.I. Full-genome study of gene expression in lumbar spinal cord of mice after 30-day space flight on Bion-M1 biosatellite. *Acta Astronautica*, 2016, vol. 122, pp. 231-236. DOI: 10.1016/j.actastro.2016.01.026.
17. Кузнецов М.С., Резвяков П.Н., Лисюков А.Н., Волков К.Д., Исламов Р.Р., Никольский Е.Е. Транскриптомный профиль спинного мозга мыши после 30-суточного космического полета на биоспутнике «Бийон-М1» и последующей 7-суточной реадaptации на Земле. *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2017, т. 51, № 7. DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-85-87. [Kuznecov M.S., Rezvyakov P.N., Lisyukov A.N., Volkov K.D., Islamov R.R., Nikol'skiy E.E. Transkriptomnyj profil' spinnogo mozga myshi posle 30-sutochnogo kosmicheskogo poleta na biosputnike «Bion-M1» i posleduyushchej 7-sutochnoj readaptacii na Zemle. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya medicina*, 2017, vol. 51, no. 7. (In Russ.)]

THE DYNAMICS OF GENE EXPRESSION IN THE LUMBAR SPINAL CORD AND SCIATIC NERVE OF MICE IN MODELING HYPOGRAVITY

Shaymardanova G.F.,^{1,2} Gaysin I.A.,² Vasilyeva A. R.,² Krasnova L.A.²

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS
Lobachevsky st. 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: gulnara-f-kzn@mail.ru

² Kazan State Medical University
Butlerov st. 49, Kazan, 420012, Russia

Abstract. The work gives a characteristic of the transcriptional activity of the *dlg4*, *mpz*, *anxa5*, *agrn*, *chat* genes in the motor neurons of the lumbar spinal cord and in the sciatic nerve of mice under long-term (30 days) hind limb unloading in comparison with the control group under normal vivarium conditions. Corresponding proteins play an important role in maintaining the structure and conductivity of the peripheral nerve. Selected genes, according to the results of previous studies, increased the level of activity after a 30-day spaceflight. The organization of a model experiment on Earth allowed to trace the dynamics of changes depending on the duration of hanging, and also to compare their manifestations in neurons of the lumbar spinal cord and in the sciatic nerve. According to our data, there is an approximately two-week period during which the system tries to function without radical changes in its metabolism. After this period, adaptation mechanisms results in the sharp activation of these genes (except of *mpz*).

Key words: hind limb unloading, gene expression, sciatic nerve.

РОЛЬ $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -КОТРАНСПОРТА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ГЛАДКИХ МЫШЦ СОСУДОВ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Бирулина Ю.Г.¹, Буйко Е.Е.^{1,2}, Габитова И.О.¹, Иванов В.В.¹, Смаглий Л.В.¹,
Носарев А.В.¹, Ковалев И.В.¹, Гусакова С.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет
Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: birulina20@yandex.ru

² Томский политехнический университет
пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. Регуляция сосудистого тонуса обеспечивается констрикторной активностью гладкомышечных клеток (ГМК), находящихся в стенках кровеносных сосудов. Изменение сократительных ответов ГМК может происходить при различных патологических состояниях, в том числе и при метаболическом синдроме (МС). Наряду с кальциевой и калиевой проводимостью мембраны ГМК, особое значение в развитии сосудистой дисфункции имеет $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспортер (NKCC), обеспечивающий симпорт ионов натрия, калия и хлора. Модель МС выполнена на крысах-самцах Wistar, которые были распределены на контрольную и опытную группы. Крысы контрольной группы получали стандартный корм. Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель содержали на высокожировой и высокоуглеводной диете, обогащенной животным жиром и фруктозой. Сократительную активность гладкомышечных сегментов аорты крыс контрольной и экспериментальной групп исследовали механографическим методом, электрические свойства изучали методом двойного сахарозного моста. Установлено, что при стимуляции сокращений гладких мышц аорты агонистом адренорецепторов фенилэфрином происходило снижение амплитуды контрактуры сегментов крыс экспериментальной группы. Подавление сократительных ответов и чувствительности ГМК аорты крыс с МС сопряжено со снижением вода ионов Ca^{2+} через кальциевые каналы. У животных, содержащихся на высокожировой и высокоуглеводной диете, наблюдалось снижение вазорелаксирующего действия ацетилхолина, что доказывает развитие эндотелиальной дисфункции при МС. Предобработка кольцевых сегментов буметанидом, ингибитором NKCC, вызывала снижение сократительной активности и мембранного потенциала ГМК аорты крыс экспериментальной группы. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности трансмембранных ионных токов, в том числе обусловленных оперированием NKCC, в регуляцию сокращений гладких мышц сосудов при МС.

Ключевые слова: $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт, гладкомышечные клетки, метаболический синдром.

Метаболический синдром (МС) является одной из наиболее актуальных проблем современной биомедицины и представляет собой кластер факторов повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [1-3]. Во всём мире распространенность МС довольно высока. В разных популяциях в соответствии с критериями Международной федерации диабета она составляет 27,5-68,7% [4, 5]. В последние годы в большинстве стран мира и в нашей стране значительно увеличилось число лиц с ожирением, что и определило возросшую распространенность МС [6]. Абдоминальное ожирение само по себе может вызывать системный окислительный стресс, а возникновение окислительного стресса в жировой ткани рассматривается в качестве основной причины дисрегуляции адипокинов и развития МС [7, 8]. Как известно, окислительный стресс вызывает нарушение соотношения между продукцией активных форм кислорода и антиоксидантными защитными факторами.

Дисбаланс выработки адипокинов, инсулинорезистентность, дисрегуляция метаболизма липидов, окислительный стресс и системное воспаление при МС способствуют развитию эндотелиальной дисфункции и повреждению гладкомышечных клеток (ГМК) кровеносных сосудов [9, 10]. ГМК занимают центральное место в регуляции просвета сосудов, а, следовательно, системного артериального давления (АД). В результате изменения их сократительной функции, диспропорциональности эффектов вазоконстрикторных и вазодилатационных эндотелиальных факторов нарушается регуляция сосудистого тонуса, повышается внутрисосудистое сопротивление, увеличивается чувствительность сосудистой стенки к прессорным воздействиям, что в конечном итоге приводит к развитию артериальной гипертензии [10, 11].

Сократительные реакции клеток гладкой мускулатуры в значительной степени определяются их мембранным потенциалом, активностью ион-транспортующих систем, набором рецепторов, сигнальных молекул и сократительных белков, необходимых для поддержания артериального тонуса [12-14]. Следовательно, любое изменение свойств или функций этих элементов может приводить к сосудистой дисфункции. Документировано, что ожирение и МС модулируют экспрессию и активность ионных каналов в мышечных клетках [15]. Главным образом, это характерно для кальциевых и калиевых каналов, как основополагающих эффекторных механизмов регуляции электрогенеза и сократительных ответов ГМК. В то же время, роль электронейтрального котранспортера катионов и хлора ($\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорт, NKCC), как возможной

мишени для регуляции сосудистого тонуса при МС, только начинает раскрываться, как и вклад хлорной проводимости мембраны миоцитов.

Целью настоящей работы явилось изучение механизмов регуляции сократительной активности гладких мышц аорты крыс при МС.

Модель МС была воспроизведена на аутбредных крысах Wistar (массой от 180 до 250 г, возраст на начало исследования 6 недель). Исследования выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Хельсинкской декларации и Европейского сообщества (86/609/ЕЕС). Животные содержались в стандартных условиях вивария с 12-часовой продолжительностью светового дня и свободным доступом к пище и воде. Случайным образом крысы были распределены на контрольную и экспериментальную группу (по 11 и 12 животных, соответственно). Крысы контрольной группы содержали на стандартной диете (корм «Дельта Фидс», Биопро, РФ). Крысы экспериментальной группы в течение 12 недель получали рацион, содержащий стандартный корм (66%) с добавлением животного жира (17%), фруктозы (17%), а питьевая вода была заменена на 20% раствор фруктозы. Животных выводили из эксперимента CO_2 -асфиксией.

Изучение механического напряжения (МН) изолированных интактных и деэндотелизированных гладкомышечных сегментов аорты крыс контрольной и опытной групп выполняли методом механографии с использованием четырехканальной системы Myobath II и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия). Полученные сосудистые гладкомышечные сегменты помещали в рабочие аэрируемые камеры экспериментальной установки объемом 10 мл, растягивали нагрузкой 500 мг и фиксировали с помощью стальных крючков в соответствии с рисунком 1. После чего камеры заполняли физиологическим солевым раствором Кребса и термостатировали при $37,0 \pm 0,5$ °С. Физиологический раствор Кребса содержал (в мМ): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 CaCl_2 , 1,2 MgCl_2 , 5,5 глюкозы, 15 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (pH 7,4). Перед началом исследования сегменты аорты крыс отмывали физиологическим раствором в течение 40-50 мин (pH 7,35-7,4), после чего дважды вызывали сокращение гиперкалиевым раствором Кребса (эквиволярно замещали 30 мМ NaCl на KCl). В ряде экспериментов сократительные реакции ГМК вызывали добавлением в раствор Кребса α_1 -адреномиметика фенилэфрина (ФЭ, 1 мкМ). Амплитуду сократительных ответов на действие гиперкалиевого раствора Кребса или ФЭ считали контрольной и принимали за 100 %.

Регистрация электрической активности гладкомышечных препаратов аорты крыс контрольной и экспериментальной группы производилась с помощью установки двойного сахарозного моста (программное обеспечение L-Graph-II, «Л-КАРД», Россия). В качестве контрольных параметров (100 %) служили значения амплитуды пиковых компонент мембранного потенциала (МП), длительность МП, амплитуда сокращений гладкомышечного препарата в растворе Кребса.

Статистический анализ экспериментальных данных проводили при помощи программы IBM SPSS Statistics 23 методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Данные описывали с использованием медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_1 - Q_3). Для оценки достоверности различий количественных показателей применяли непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни (U test Mann-Whitney) для независимых и T-критерий Вилкоксона (Wilcoxon Signed Ranks Test) для зависимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Содержание крыс на высокожировой, высокоуглеводной диете в течение 12 недель приводило к приросту массы тела животных, увеличению АД, развитию гипергликемии и снижению толерантности к глюкозе. Установлено, что при действии хлорида калия в концентрациях от 10 по 50 мМ не наблюдалось достоверных отличий МН кольцевых сегментов сосудов крыс контрольной и опытной групп. При стимуляции сокращений

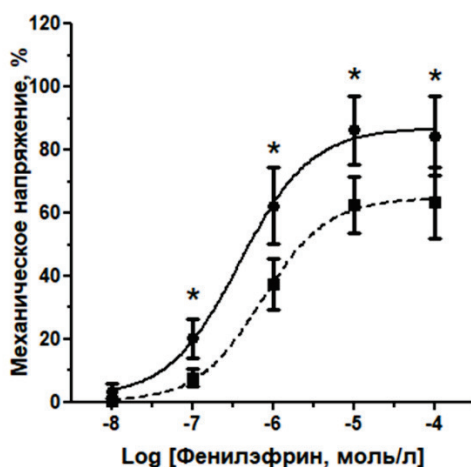


Рисунок 1. Изменение сократительной активности гладкомышечных сегментов аорты крыс при действии фенилэфрина. Сплошная линия – контрольная группа, пунктирная линия – экспериментальная группа, * – достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,05$)

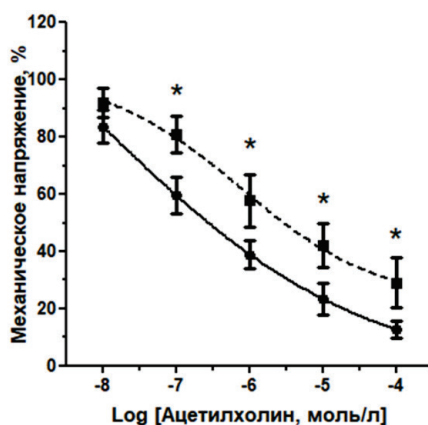


Рисунок 2. Изменение МН гладкомышечных сегментов аорты крыс при действии ацетилхолина. Обозначения как на рисунке 1

гладких мышц аорты агонистом адренорецепторов ФЭ в концентрациях от 0,01 до 100 мкМ происходило дозозависимое снижение амплитуды контрактуры сегментов сосудов большого круга кровообращения крыс контрольной и экспериментальной группы (рис. 1).

В исследованиях с сосудистыми сегментами аорты животных контрольной и опытной группы величина EC_{50} составила $8,3 \times 10^{-7}$ М и $4,9 \times 10^{-6}$ М, соответственно.

Подавление сократительных ответов и чувствительности ГМК аорты крыс с МС к действию ФЭ может быть сопряжено со снижением поступления ионов Ca^{2+} в цитоплазму ГМК и развития поддерживаемого сокращения. Кумулятивное действие блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипина (0,001-10 мкМ) вызывало угнетение ФЭ-индуцированного сокращения сегментов аорты крыс контрольной и опытной группы ($n=6$, $p<0,05$), достоверно меньше у крыс с МС.

Одним из важнейших механизмов короткодистантной регуляции является эндотелий-зависимый контроль сократительных реакций гладких мышц сосудов [11]. Влияние агониста мускариновых рецепторов ацетилхолина (0,01-100 мкМ) на интактные гладкомышечные сегменты аорты крыс контрольной и экспериментальной группы на фоне аппликации ФЭ вызывало дозозависимое снижение амплитуды сокращений сосудистых ГМК в соответствии с рисунком 2 ($n=6$, $p<0,05$). При этом релаксирующий эффект ацетилхолина был статистически значимо ниже в группе крыс с МС ($n=6$, $p<0,05$), а EC_{50} увеличилось с $1,7 \times 10^{-7}$ М до $4,8 \times 10^{-7}$ М. В присутствии ацетилхолина (10 мкМ) наблюдалось снижение МП сосудистых гладких мышц аорты крыс контрольной и опытной группы. В ГМК крыс с МС падение МП было достоверно меньше, чем в контрольной группе животных ($p<0,05$). Известно, что ацетилхолин активирует поступление ионов Ca^{2+} в клетки эндотелия, что повышает активность эндотелиальной NO-синтазы и приводит к синтезу и накоплению NO, который обладает сосудорасширяющим действием. В свою очередь, снижение вазорелаксирующего действия ацетилхолина может свидетельствовать о развитии эндотелиальной дисфункции при МС [16].

Учитывая важную роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта (NKCC) в поддержании неравновесного электрохимического потенциала ионов хлора, можно полагать, что объем-зависимый ионный транспорт может быть вовлечен в регуляцию сократительной и электрической активности ГМК при МС. Одним из предполагаемых механизмов действия селективного ингибитора NKCC буметанида является его способность вызывать гиперполяризацию мембраны ГМК за счет снижения NKCC-опосредованного хлорного градиента и, таким образом, подавления входящих потенциал-зависимых кальциевых токов [17].

Предобработка буметанидом (100 мкМ) гладкомышечных сегментов не изменяла исходного МН и МП сосудистых ГМК. Однако на фоне действия ингибитора NKCC происходило снижение амплитуды сокращений и величины МП ГМК аорты крыс контрольной и экспериментальной групп, вызванных действием гиперкалиевого раствора и ФЭ, в большей степени, характерное для сосудистых гладких мышц крыс с МС (табл. 1).

Таблица 1. Влияние NKCC на электрическую и сократительную активность гладких мышц аорты крыс с МС при действии фенилэфрина

Параметр	Контрольная группа		Экспериментальная группа	
	-Буметанид	+Буметанид	-Буметанид	+Буметанид
Амплитуда МП (%) ($n=8$)	100	96,5* (85,6-106,8)	100	90,1*# (81,8-110,6)
Длительность МП (%) ($n=8$)	100	97,2 (90,9-105,2)	100	89,5# (81,3-109,4)
Амплитуда сокращения (%) ($n=8$)	100	93,6* (83,1-108,3)	100	88,8*# (76,9-103,9)

Примечание – Различия по сравнению с контрольной группой (*), различия по сравнению с данными в отсутствии буметанида (#)

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что вазоконстрикторные реакции мышечных клетках на фоне метаболических и гемодинамических нарушений при МС, вероятно, обусловлены увеличением активности НКСС. Таким образом, установлено, что сократительные реакции сосудистых ГМК при МС обусловлены не только нарушением эндотелиально-гладкомышечных взаимодействий, но и изменением кальциевой проводимости их мембраны, модуляцией активности НКСС и хлорной проводимости. Полученные результаты о вовлеченности трансмембранных ионных токов в регуляцию сокращений и МП гладких мышц сосудов и открывают перспективы для разработки и тестирования новых лекарственных препаратов, направленных на коррекцию сосудистой дисфункции при МС.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Томской области в рамках научного проекта №19-415-703015.

Список литературы / References:

1. Ройтберг Г.Е. *Метаболический синдром*. М.: МЕД-М54 пресс-информ, 2007, 224 с. [Roytberg G.E. *Metabolic Syndrome*. M.: MED-M54 press-inform, 2007, 224 p. (In Russ.)]
2. Potenza M.V., Mechanick J.I. The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology. *Nutr. Clin. Pract.*, 2009, vol. 24, no. 5, pp. 560-577. DOI: 10.1177/0884533609342436.
3. Aydin S., Aksoy A., Aydin S., Kalayci M., Yilmaz M., Kuloglu T., Cital C., Catak Z. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*, 2014, vol. 30, no. 1, pp. 1-9. DOI: 10.1016/j.nut.2013.05.013.
4. Moore J.X., Chaudhary N., Akinyemiju T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. *Prev. Chronic. Dis.*, 2017, vol. 14, p. E24. DOI: 10.5888/pcd14.160287.
5. Ranasinghe P., Jayawardena R., Katulanda P., Constantine G.R., Ramanayake V., Galappaththy P. Translation and Validation of the Sinhalese Version of the Brief Medication Questionnaire in Patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes Res.*, 2018, vol. 2018, p. 62. DOI: 10.1155/2018/7519462.
6. Hossain P., Kavar B., Nahas M.E. Obesity and diabetes in the developing world – a growing challenge. *N. Engl. J. Med.*, 2007, vol. 356, no. 3, pp. 213-215. DOI: 10.1056/NEJMp068177.
7. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 2004, vol. 114, no. 12, pp. 1752-1761. DOI: 10.1172/JCI21625.
8. Kobayashi R., Akamine E.H., Davel A.P., Rodrigues M.A., Carvalho C.R., Rossoni L.V. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J. Hypertens.*, 2010, vol. 28, no. 10, p. 2111-2119. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833ca68c.
9. Bondia-Pons I., Ryan L., Martinez J.A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J. Physiol. Biochem.*, 2012, vol. 68, no. 4, pp. 701-711. DOI: 10.1007/s13105-012-0154-2.
10. Berg A.H., Scherer P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 2005, vol. 96, no. 9, pp. 939-949. DOI: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
11. Hartge M.M., Unger T., Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 2007, vol. 4, no. 2, pp. 84-88. DOI: 10.3132/dvdr.2007.025.
12. Navedo M.F., Amberg G.C., Votaw V.S., Santana L.F. Constitutively active L-type Ca^{2+} channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 31, pp. 11112-11117. DOI: 10.1073/pnas.0500360102.
13. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr. Physiol.*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 485-581. DOI: 10.1002/cphy.c160011.
14. Носарев А.В., Бирulina Ю.Г., Ковалев И.В., Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Петрова И.В., Рыдченко В.С., Поливщикова В.А., Медведев М.А. Роль Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта в H_2S -опосредованной регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток легочной артерии крыс. *Артериальная гипертензия*, 2017, т. 23, № 5, с. 395-402. [Nosarev A.V., Birulina Yu.G., Kovalev I.V., Smaglii L.V., Gusakova S.V., Petrova I.V., Rydchenko V.S., Polivshchikova V.A., Medvedev M.A. The role of Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport in the H_2S -dependent regulation of contractile activity of smooth muscle cells from rat pulmonary artery. *Arterial Hypertension*, 2017, vol. 23, no. 5, pp. 395-402. (In Russ.)]. DOI: 10.18705/1607-419X2017-23-5-395-402.
15. Lu T., Ye D., He T., Wang X.L., Wang H.L., Lee H.C. Impaired Ca^{2+} -dependent activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in the coronary artery smooth muscle cells of Zucker Diabetic Fatty rats. *Biophys. J.*, 2008, vol. 95, no. 11, pp. 5165-5177. DOI: 10.1529/biophysj.108.138339.
16. Носарев А.В., Бирulina Ю.Г., Петрова И.В., Ковалев И.В., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Тесля Е.С., Шаманаев А.Ю., Пушкина Е.В., Медведев М.А. Особенности ион-транспортных процессов в модели артериальной гипертензии. *Бюллетень сибирской медицины*, 2018, т. 17, № 4, с. 103-109. [Nosarev A.V., Birulina Yu. G., Petrova I.V., Kovalev I.V., Gusakova S.V., Smaglii L.V., Teslya E.S., Shamanaev A. Yu., Pushkina E.V., Medvedev M.A. Features of ionic transport processes in a model of arterial hypertension. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2018, vol. 17, no. 4, pp. 103-109. (In Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-103-109.
17. Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Dulin N.O. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes Dis.*, 2015, vol. 2, no. 2, pp. 186-196. DOI: 10.1016/j.gendis.2015.02.007.

ROLE OF Na^+ , K^+ , 2Cl^- COTRANSPORT IN THE REGULATION OF CONTRACTILE REACTIONS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES IN METABOLIC SYNDROME**Birulina J.G.¹, Buyko E.E.^{1,2}, Gabitova I.O.¹, Ivanov V.V.¹, Smaglyi L.V., Nosarev A.V.¹, Kovalev I.V.¹
Gusakova S.V.¹**¹ Siberian State Medical University

Moskovsky trakt, 2, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: birulina20@yandex.ru

² Tomsk Polytechnic University

Lenina av., 30, Tomsk, 634050, Russia

Abstract. The vascular tone regulation is provided by contractile activity of smooth muscle cells (SMC) located in the vessel wall. Change in SMC contractile responses may occur in case of various pathological conditions, including metabolic syndrome (MS). Along with the calcium and potassium conductance in the SMC membrane, Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter (NKCC), which provides a symport of sodium, potassium and chlorine ions, is of great importance in the vascular dysfunction's development. Male Wistar rats were used for MS modeling. Rats were divided into control and experimental groups. The rats from the control group were fed with standard laboratory diet. The rats from the experimental group were fed with a high-fat, high-carbohydrate diet rich in lard and fructose for 12 weeks. The contractile activity of the smooth muscle segments in the aorta of control rats and animals of experimental groups was studied by the mechanographic method. Its electrical properties were studied by the double sucrose-gap technique. It was found that stimulation of aortic smooth muscle contractile activity by an adrenoceptor agonist phenylephrine leads to the decrease in the amplitude of experimental rats' segments contracture. The suppression of the contractile responses and aorta SMC sensitivity in rats with MS is associated with a decrease in the Ca^{2+} ions input through calcium channels. Animals fed with high-fat, high-carbohydrate diet had demonstrated a decreased vasorelaxing effect of acetylcholine, which proves the development of endothelial dysfunction in MS. The pretreatment of the ring segments with bumetanide, an NKCC inhibitor, had led to a decrease in the contractile activity and membrane potential in aortic SMC of experimental rats. The data obtained indicate the involvement of transmembrane ion currents in the vascular smooth muscle contractions regulation in the state of MS, including the NKCC-cooperated ones.

Key words: Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransport, smooth muscle cells, metabolic syndrome.

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИТА ИЗ НАНОВОЛОКОН ОКСИДА АЛЮМИНИЯ И НАНОАЛМАЗОВ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Ронжин Н.О.¹, Посохина Е.Д.^{1,2}, Михлина Е.В.³, Симунин М.М.²,
Рыжков И.И.^{2,3}, Бондарь В.С.¹

¹ Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

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

² Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

³ Институт вычислительного моделирования ФИЦ КНЦ СО РАН

ул. Академгородок, 50/44, г. Красноярск, 660036, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. Смешиванием коллоидно стабильных водных суспензий нановолокон оксида алюминия (НВОА) и модифицированных наноалмазов (МНА) детонационного синтеза при весовом соотношении компонентов 5:1 с последующей инкубацией смеси при 32 °С и вакуумной фильтрацией изготовлен композиционный материал (НВОА-МНА) в форме диска диаметром 40 мм. Высказано предположение, что образование композита происходит за счет разницы дзета-потенциалов НВОА и МНА, обеспечивающей электростатическое взаимодействие и связывание наноматериалов. Исследования показали, что в водных суспензиях МНА имеют отрицательный дзета-потенциал, составляющий –46.5 мВ, в то время как НВОА – положительный, составляющий 44 мВ. Данные сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии показали, что полученный композит имеет сетчатую структуру, в которой кластеры МНА распределены по поверхности НВОА. Результаты низкотемпературной адсорбции азота свидетельствуют, что в сетчатой структуре композита НВОА-МНА наблюдается увеличение размера пор и удельной поверхности, по сравнению с материалом матрицы из НВОА. Установлено, что в составе композита МНА проявляют каталитическую функцию и обеспечивают образование цветного продукта в реакции соокисления фенола с 4-аминоантипирином в присутствии H₂O₂. В модельных экспериментах показана применимость композита НВОА-МНА для многократного тестирования фенола в водной среде.

Ключевые слова: наноалмазы, нановолокна оксида алюминия, композит, катализатор, система индикации, фенол.

Наноалмазы детонационного синтеза являются перспективным наноматериалом в конструировании новых средств индикации и диагностики для биомедицинской аналитики и экологического мониторинга [1-4]. Широкий спектр химически активных групп и микропримесей металлов на поверхности наночастиц [5] открывает возможности их использования в качестве самостоятельного сенсорного элемента [3,6] и как носителя для иммобилизации биомаркеров [7-9] при создании аналитических систем. Следует отметить, что иммобилизация сенсорного элемента (наночастицы алмаза или комплекс наноалмазы-биомаркер(ы)) на/в твердой матрице будет способствовать адаптации конструируемых систем для их практического применения, особенно, при создании систем многоразового действия. Данное исследование состояло в получении композита из наноалмазов и нановолокон оксида алюминия и изучении его физико-химических свойств.

В работе использовали модифицированные наноалмазы (МНА) с высокой коллоидной стабильностью в водных суспензиях и средним размером кластеров 55 нм. МНА получали из коммерческих наноалмазов взрывного синтеза (ООО «Реал-Дзержинск, Россия) оригинальным способом [10]. Матрицей для фиксации МНА являлись нановолокна оксида алюминия (НВОА) диаметром 10–15 нм и длиной до нескольких микрометров (ANF Technology, Эстония) [11].

Изготовление нанокompозита проводили согласно схеме, представленной на Рисунке 1. Суспензию НВОА готовили в деионизованной воде изложенным ранее способом [12]. К навеске материала Nafen™ добавляли деионизованную воду и диспергировали нановолокна перемешиванием суспензии на магнитной мешалке в течение 30 мин. После этого суспензию обрабатывали ультразвуком (Sonics & Materials VC–505, 22 kHz, США) в течение 15 мин для придания НВОА большей коллоидной устойчивости. В результате ультразвуковой обработки исходная длина нановолокон уменьшалась до нескольких мкм. Приготовленную суспензию НВОА и гидрозолю МНА смешивали при весовом соотношении компонентов 5:1 и инкубировали полученную смесь в течение 15 мин при 32 °С при постоянном, интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. После этого проводили вакуумную фильтрацию проинкубированной смеси через фторопластовый фильтр (диаметр пор 0,6 мкм), на поверхности которого из полученного композита формировался круглый диск диаметром 40 мм [12]. Для сравнительных исследований в качестве контроля использовали диски, полученные аналогичным образом из НВОА. Все сформированные диски подвергали термообработке при 300 °С (вакуумная электропечь Спарк-Дон Микротерм 95) для придания исходной матрице и композиту структурной стабильности в водных растворах.

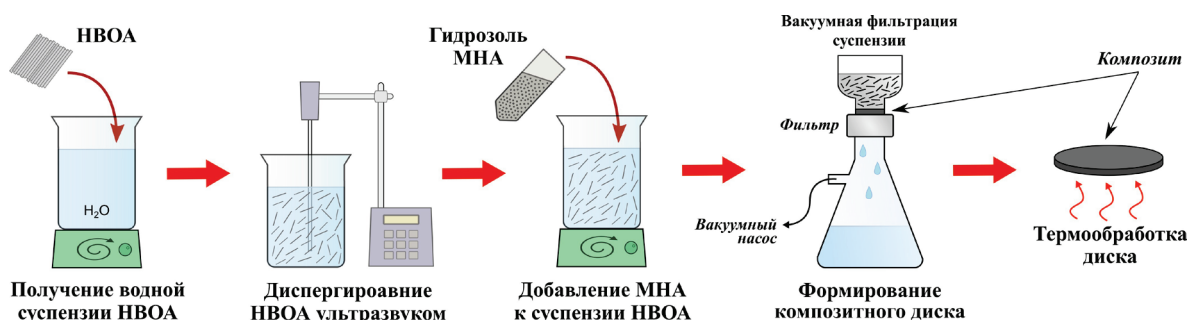


Рисунок 1. Стадии получения композита НВОА-МНА

Исследования структуры композита НВОА-МНА выполнены с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии – СЭМ и ПЭМ, соответственно. Для исследований методом СЭМ образцы композита покрывали платиной с помощью магнетронного распыления в атмосфере аргона в течение 1 мин при токе 10 мА и давлении $8 \cdot 10^{-6}$ бар, чтобы предотвратить зарядку диэлектрических нановолокон в ходе эксперимента. Анализ образцов проводили на микроскопе Hitachi S – 5500 (Япония) при напряжении 3 кВ. Для изучения структуры композита методом ПЭМ образцы диспергировали в этаноле с помощью ультразвукового гомогенизатора в течение 10 мин при мощности 100 Вт и полученную дисперсию осаждали на покрытую углеродом медную сетку. Образцы анализировали на микроскопе Hitachi HT – 7700 (Япония) при ускоряющем напряжении 110 кВ.

Эксперименты по низкотемпературной адсорбции азота проводили на ASAP-2420 (Micromeritics, США) для характеристики пор и площади поверхности мембраны композита и матрицы. Образцы загружали в калиброванные мерные пробирки и дегазировали в течение 6-8 ч при 150-200 °С в вакууме. После коррекции массы образцов пробирки переводили в схему анализа для регистрации изотермы. Расчеты текстурных характеристик рассматриваемого материала проводили с использованием моделей BET, VJH и t-plot.

Каталитическую активность МНА, инкорпорированных в композит, оценивали с помощью реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-аминоантипирин – пероксид водорода), в результате которой образуется цветной продукт [13]. Для проведения анализа из дисков композита вырезали фрагменты размером 5 x 5 мм, которые помещали в реакционную смесь объемом 1 мл, содержащую 5,96 мМ фенола, 0,49 мМ 4-аминоантипирин и 8,8 мМ H_2O_2 . Реакцию проводили при 25 °С в течение 10 мин. После этого фрагменты дисков извлекали и спектральным методом (спектрофотометр UV-1800, Shimadzu, Япония) оценивали количество образовавшегося в реакционной смеси цветного продукта по величине оптической плотности при длине волны 506 нм. В параллельных экспериментах реакцию азосочетания проводили с использованием фрагментов контрольных дисков (матрицы) для оценки образования цветного продукта под действием НВОА.

При исследованиях применимости композита НВОА-МНА для многократного тестирования фенола в водных образцах использовали пробы реакционной смеси с одинаковой концентрацией аналита. Фрагмент композитного диска помещали в тестируемую пробу и проводили реакцию азосочетания, как изложено выше. После этого фрагмент диска извлекали из реакционной смеси и оценивали в ней количество образовавшегося продукта. Фрагмент диска промывали деионизованной водой для отмывки композита от остатков компонентов и продукта реакции. Отмытый композит помещали в новую пробу реакционной смеси и вновь проводили реакцию.

Показано, что при использованных условиях эксперимента (весовое соотношение компонентов, время и температура инкубации) частицы МНА нацело и прочно связываются с НВОА. Образование композита НВОА-МНА, вероятно, происходит за счет разницы дзета-потенциалов изучаемых наноматериалов, обеспечивающей их электростатическое взаимодействие и связывание. Исследования показали, что в водных суспензиях с нейтральным значением pH МНА имеют отрицательный дзета-потенциал, составляющий –46,5 мВ, в то время как НВОА – положительный, составляющий 44 мВ. Методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии образцов выявлено, что поверхностный заряд МНА определяется наличием карбоксильных и кетонных групп, в то время как НВОА могут проявлять амфотерные свойства в реакции диссоциации гидроксида алюминия.

Изображения, полученные в исследованиях методами СЭМ и ПЭМ, позволили установить (рис. 2), что в ходе вакуумной фильтрации смеси, содержащей композит НВОА-МНА, происходит послойная укладка нановолокон в горизонтальной плоскости в хаотичном направлении, в результате чего композит приобретает сетчатую (пористую) структуру, в которой кластеры наноналмазов распределены по поверхности нановолокон.

Результаты сравнительных экспериментов по низкотемпературной адсорбции азота показали, что в структуре композиционного материала НВОА-МНА, наблюдается увеличение размера пор и удельной поверхности, по сравнению с контрольным материалом матрицы из НВОА. Относительный максимум распределения размера пор смещается от 32 нм для материала из НВОА до 41 нм для композита НВОА-МНА. Общий объем пор увеличивается от 0,72 $\text{см}^3/\text{г}$ (матрица из НВОА) до 1,10 $\text{см}^3/\text{г}$ (композит НВОА-МНА), а удельная площадь увеличивается от 139 $\text{м}^2/\text{г}$ до 175 $\text{м}^2/\text{г}$, соответственно. Исходя из этого, можно заключить, что в композиционном материале нановолокна расположены дальше друг от друга из-за связавшихся с ними частиц МНА и формируют поры более крупного размера. При этом кластеры МНА за счет площади своей поверхности увеличивают удельную площадь поверхности пористого композита НВОА-МНА.

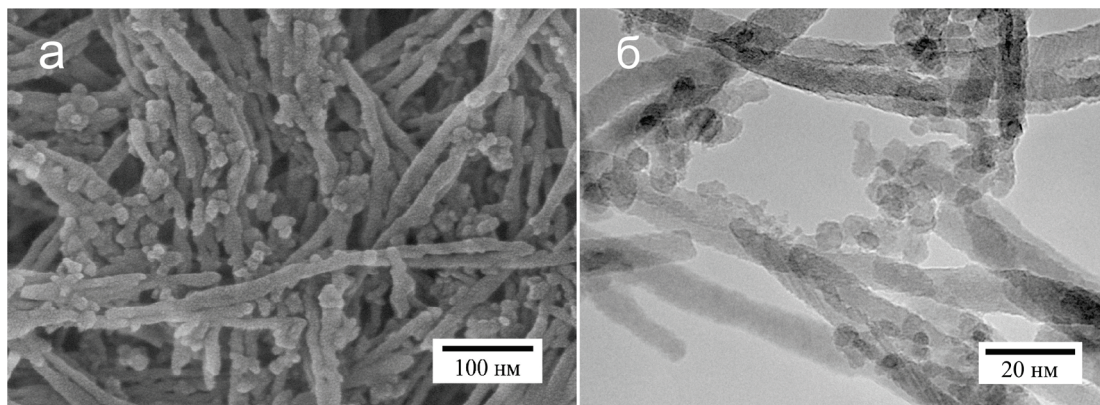


Рисунок 2. Изображения структуры композита НВОА-МНА, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (а) и просвечивающей электронной микроскопии (б)

Как показали исследования, входящие в состав композита МНА, катализируют реакцию окислительного азосочетания с образованием цветного продукта (Рисунок 3). При этом было показано, что исходная матрица из НВОА не катализирует данную реакцию. Ранее мы установили, что каталитический эффект МНА в реакции азосочетания обеспечивается микропримесями ионов железа и меди на поверхности наночастиц [3]. Это позволяет говорить, что данные каталитические центры на поверхности МНА, инкорпорированных в матрицу, доступны для взаимодействия с компонентами указанной реакции. В то же время, результаты сравнительных экспериментов с одинаковым содержанием МНА в водной суспензии и в составе композита показали, что каталитическая эффективность МНА в композите составляла 50% от активности свободных наночастиц в суспензии (рис. 3). По-видимому, наблюдаемые различия могут быть объяснены тем, что при связывании с НВОА каталитические центры на поверхности части МНА экранируются и в композите становятся недоступны для взаимодействия с компонентами реакции азосочетания. Нельзя также исключить, что выявленное снижение каталитической эффективности МНА композиционного материала связано с диффузионными процессами и лимитируется скоростью проникновения компонентов реакции к наночастицам в глубоких слоях композита. Выяснение этого вопроса требует дальнейшего изучения.

В модельных экспериментах продемонстрирована применимость композита НВОА-МНА для многократного тестирования фенола в водной среде. Из полученных данных (рис. 4) видно, что в детектируемых пробах с одинаковой концентрацией аналита наблюдается практически одинаковый выход цветного продукта после проведения реакции азосочетания с использованием одного и того же образца композита.

Таким образом, в результате проведенных исследований получен композит на основе матрицы НВОА и МНА детонационного синтеза в качестве сенсорного элемента, обладающий структурной стабильностью в водных средах. Исходя из экспериментальных данных, высказано предположение, что образование композита определяется разницей дзета-потенциалов НВОА и МНА, обеспечивающей электростатическое взаимодействие и связывание наноматериалов. Результаты исследований композита НВОА-МНА методами СЭМ и ПЭМ свидетельствуют, что он обладает сетчатой структурой, в которой кластеры наноалмазов распределены по

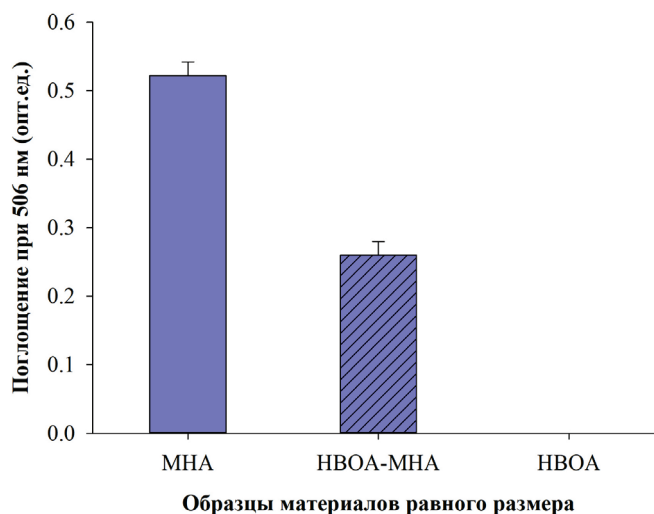


Рисунок 3. Образование цветного продукта при проведении реакции окислительного азосочетания с применением гидрозоля МНА и фрагментов дисков из композита НВОА-МНА, содержащих одинаковое количество наноалмазов, и использованием фрагментов дисков и НВОА

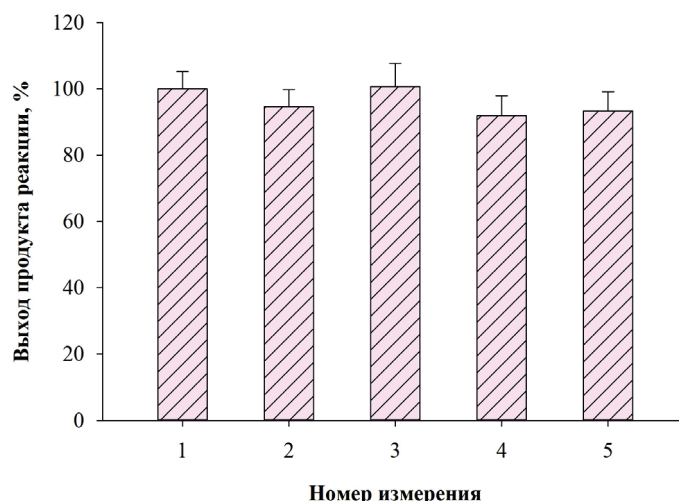


Рисунок 4. Выход продукта реакции азосочетания при последовательном многократном использовании композита НВОА-МНА для детекции фенола в водных образцах с одинаковой концентрацией аналита

поверхности нановолокон. Эксперименты низкотемпературной адсорбции азота показали увеличение размера пор и удельной поверхности в сетчатой структуре композита, по сравнению со значениями этих показателей в структуре матрицы НВОА. Установлено, что инкорпорированные в матрицу МНА проявляют каталитическую активность и обеспечивают образование цветного продукта при проведении реакции соокисления фенола с 4-аминоантипирином в присутствии пероксида водорода. В модельных экспериментах показана применимость композита НВОА-МНА для многократного тестирования фенола в водных образцах. Совокупность полученных данных создает предпосылки создания на основе композита НВОА-МНА нового класса систем индикации (например, 2D- и 3D-датчиков) многократного действия для экологического мониторинга загрязнений водной среды фенолом и его соединениями.

Список литературы / References:

1. Kumar V., Kaur I., Arora S., Mehla R., Vellingiri K., Kim K.-H. Graphene nanoplatelet/graphitized nanodiamond-based nanocomposite for mediator-free electrochemical sensing of urea. *Food Chemistry*, 2020, vol. 303. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125375.
2. Zambianco N.A., Silva T.A., Zanin H., Fatibello-Filho O., Janegitz B.C. Novel electrochemical sensor based on nanodiamonds and manioc starch for detection of diquat in environmental samples. *Diamond and Related Materials*, 2019, vol. 98. DOI: 10.1016/j.diamond.2019.107512.
3. Ronzhin N., Puzyr A., Bondar, V. Detonation nanodiamonds as a new tool for phenol detection in aqueous medium. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2018, vol. 18. DOI: 10.1166/jnn.2018.15382.
4. Simioni N.B., Silva T.A., Oliveira G.G., Filho O.F. A nanodiamond-based electrochemical sensor for the determination of pyrazinamide antibiotic. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, vol. 250. DOI: 10.1016/j.snb.2017.04.175.
5. Gibson N., Shenderova O., Luo T. J.M., Moseenkov S., Bondar V., Puzyr A., Purtov K., Fitzgerald Z., Brenner D.W. Colloidal stability of modified nanodiamond particles. *Diamond and Related Materials*, 2009, vol. 18. DOI: 10.1016/j.diamond.2008.10.049.
6. Lin Y., Su D. Fabrication of nitrogen-modified annealed nanodiamond with improved catalytic activity. *ACS Nano*, 2014, vol. 8, no. 8. DOI: 10.1021/nn501286v.
7. Mogilnaya O., Ronzhin N., Artemenko K., Bondar V. Nanodiamonds as an effective adsorbent for immobilization of extracellular peroxidases from luminous fungus *Neonothopanus nambi* to construct a phenol detection system. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2019, vol. 37. DOI: 10.1080/10242422.2018.1472586.
8. Ronzhin N., Baron A., Puzyr A., Baron I., Burov A., Bondar V. Modified nanodiamonds as a new carrier for developing reusable enzymatic test-systems for determination of physiologically important substances. *Modern Clinical Medicine Research*, 2018, vol. 2. DOI: 10.22606/mcmr.2018.22001.
9. Camargo J.R., Baccarin M., Raymundo-Pereira P.A., Campos A.M., Oliveira G.G., Fatibello-Filho O., Oliveira Jr. O.N., Janegitz B.C. Electrochemical biosensor made with tyrosinase immobilized in a matrix of nanodiamonds and potato starch for detecting phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 2018, vol. 1034. DOI: 10.1016/j.aca.2018.06.001.
10. Puzyr A.P., Bondar V.S. *Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability*. RU Patent № 2252192, 2005, Bull. № 14.
11. Features of Nafen alumina nanofibers. URL: <http://www.anftechnology.com/nafen/>
12. Solodovnichenko V.S., Lebedev D.V., Bykanova V.V., Shiverskiy A.V., Simunin M.M., Parfenov V.A., Ryzhkov I.I. Carbon coated alumina nanofiber membranes for selective ion transport. *Advanced Engineering Materials*, 2017, vol. 19. DOI: 10.1002/adem.201700244.

13. Eremin A.N., Semashko T.V., Mikhailova R.V. Cooxidation of phenol and 4-aminoantipyrin catalyzed by polymers and copolymers of horseradish root peroxidase and *Penicillium funiculosum* 46.1 glucose oxidase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, vol. 42. DOI: 10.1134/S0003683806040119.

PRODUCTION OF COMPOSITE FROM ALUMINUM OXIDE NANOFIBERS AND NANODIAMONDS AND STUDY OF ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Ronzhin N.O.¹, Posokhina E.D.^{1,2}, Mikhlin E.V.³, Simunin M.M.², Ryzhkov I.I.^{2,3}, Bondar V.S.¹

¹ Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: roniol@mail.ru

² Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

³ Institute of Computational Modeling FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/44, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Abstract. A composite material in the form of disk with a diameter of 40 mm was fabricated by mixing colloidal stable aqueous suspensions of alumina nanofibers (ANF) and detonation synthesized modified nanodiamonds (MND) at a 5:1 weight ratio of components followed by incubating at 32 °C and vacuum filtrating the mixture. It is assumed that the interaction of ANF and MND occurs due to the difference in their zeta-potentials which provides electrostatic attraction and binding of nanomaterials. Measurements showed that in aqueous suspensions MND have a negative zeta potential of –46.5 mV, while ANF is positive, 44 mV. Scanning and transmission electron microscopy data showed that the composite has a network structure in which clusters of nanodiamonds are distributed over the ANF surface. The results of low-temperature nitrogen adsorption experiments showed that in the network structure of the obtained ANF-MND composite an increase in pore size and specific surface area is observed compared with the control material from ANF. It was found that MND incorporated into the composite exhibit a catalytic function and ensure the formation of a colored product in the co-oxidation reaction of phenol and 4-aminoantipyrine in the presence of H₂O₂. In model experiments the applicability of the ANF-MND composite for the multiple detection of phenol in an aqueous medium is shown.

Key words: nanodiamonds, aluminum oxide nanofibers, composite, catalyst, indicator system, phenol.

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ ОСВЕЩЕНИЯ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СКЛЕРЫ НА ПРИМЕРЕ ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*

Храмцова Е.А.¹, Крашенинников С.В.², Петронюк Ю.С.¹, Трофимова Н.Н.¹,
Гурьева Т.С.³, Дадашева О.А.³, Левин В.М.¹, Григорьев Т.Е.², Зак П.П.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: alyonushk@gmail.com

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ

³ Институт медико-биологических проблем РАН
ш. Хорошевское, 76а, г. Москва, 123007, РФ

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. В работе представлены предварительные данные о влиянии спектрального состава повседневного освещения (синее освещение – 450 нм; красное освещение – 630 нм, дневной свет лампы накаливания для контрольной группы) на постнатальное развитие склеры глаза японского перепела *Coturnix coturnix japonica dom.*, как широко используемой модели для исследования развития структур глаза и модели заболеваний зрительного аппарата. В условиях *in situ* исследованы толщины склер неинвазивными методами с использованием импульсной акустической микроскопии, что позволяет провести измерения с минимальными искажениями. После выделения склер были проведены механические испытания и определены основные физико-механические характеристики. Показано, что на 23 сутки постнатального развития при синем освещении при сравнении с красным наблюдается уменьшение толщины склеры ($\Delta 14\%$) в сочетании с понижением ее эластичности ($\Delta 7\%$). Результаты механических испытаний были проинтерпретированы в рамках модели высокоэластичности, основанной на не-Гауссовой статистике, оценивающей расположение основных структурных элементов склеры (внеклеточного матрикса) и выдвинуты предположения об особенностях развития склер при разном спектральном освещении. Работа выполнена в рамках задач по моделированию детской миопии.

Ключевые слова: склера, японский перепел, внеклеточный матрикс, акустическая микроскопия, физико-механические свойства, нативная ткань.

Склера совместно с роговицей образуют непрерывную соединительно-тканную капсулу, обеспечивающую помимо механической защиты и поддержки структурных элементов глаза, эмметропию глаза в условиях постоянно меняющихся внешних условий. В процессе эмбриогенеза склера дифференцируется из нейроэктодермы и мезодермы, общность происхождения склеры и хрящевой ткани сказывается при системных заболеваниях в виде отклонений в зрительном аппарате [1]. У взрослого организма склера состоит из коллагеновых фибрилл, организованных в пластины, протеогликанов, неколлагеновых гликопротеинов и фибробластов. Склера динамически ремоделируется с целью изменения размеров глаза и обеспечения рефракции всю жизнь. Одним из нарушений зрения, связанным с изменением размеров глаза, является миопия – широко распространенное заболевание, затрагивающее структуру склеры в том числе.

В качестве экспериментальных объектов в данном исследовании использовались японские перепела *Coturnix coturnix japonica dom.* на разных сроках постнатального развития (10, 23 и 65 суток). Японский перепел – широко используемая модель для медико-биологических исследований, связанных с возрастными особенностями развития различных систем организма, обладает рядом преимуществ, в том числе короткий жизненный цикл, что позволяет в течение года получить данные, соответствующие разным возрастным группам, удобство содержания, высокая яйценоскость, широкое использование птиц отряда куриные как модельных объектов для исследования зрительной системы и влияния освещения на ее развитие [2–4]. С момента вылупления птенцы находились при разных видах повседневного LED-освещения с интенсивностью излучения $0,04 \text{ мВт/см}^2$. Красное светодиодное освещение с длиной волны 630 нм, синее светодиодное освещение с длиной волны 450 нм и дневной свет лампы накаливания для контрольной группы [5]. Суточные ритмы составляли 9 часов темноты (ночь) и 15 часов освещения (день).

Глаза перепелов исследовались с помощью акустической микроскопии *in situ* для получения данных о толщине и состоянии склеры в нативном состоянии. Акустическая микроскопия является широко используемым и хорошо зарекомендовавшим себя методом в офтальмологии. Преимуществами данного метода является неинвазивность, возможность проводить исследования в динамике на живых объектах по несколько раз, естественный акустический контраст биологических тканей, отсутствие артефактов в результате гистологической проводки и изготовления срезов. Кроме того, полученные с помощью акустической микроскопии изображения, отражают не только форму, размер и строение исследуемого объекта, но и его упруго-механические характеристики, что является важным диагностическим признаком многих патологических состояний [6].

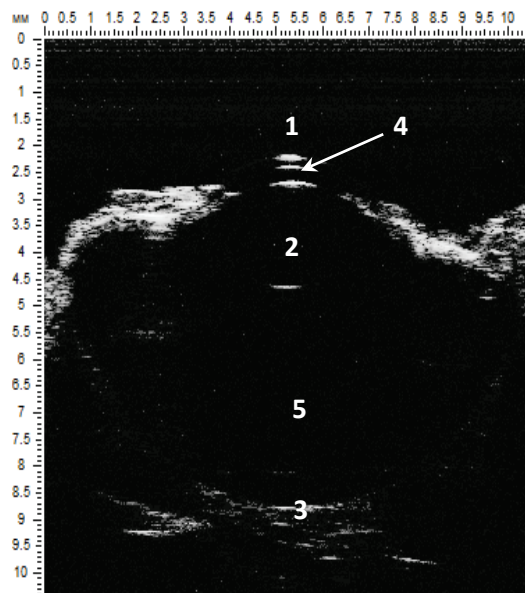


Рисунок 1. Акустическое изображение (B/D-scan) глаза перепела *in situ*. 1 – роговица, 2 – хрусталик, 3 – склера, 4 – передняя камера глаза, 5 – стекловидное тело

Измерения проводились с помощью сканирующего импульсного акустического микроскопа SIAM-2011, разработанного в лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН. Для данного эксперимента использовались длиннофокусные линзы с рабочей частотой 50-100 МГц. Такой тип линз является оптимальным для большинства биологических исследований и обеспечивает детальные изображения без потери качества в фокальной области на глубине до нескольких миллиметров. Разработанное программное обеспечение позволяет получать массив данных, соответствующий поперечному гистологическому срезу через глаз с использованием динамической фокусировки – B/D-скан, таким образом, что на одном акустическом изображении отображаются с высоким разрешением все структурные элементы глаза: роговица, передняя камера глаза, хрусталик, задняя камера глаза, стекловидное тело, склера (рис. 1). Исследования проводились при комнатной температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$, в качестве иммерсионной жидкости использовалась бидистиллированная вода. Время проведения одного эксперимента составляет около 10 минут. Оценка толщины склер *in situ* проводилась с помощью акустомикроскопических методик, что позволило добиться большей точности по сравнению с измерениями, выполненными с помощью микрометра, т.к. образец не сминается во время измерения и находится в нативном состоянии. Полученные данные о толщине склер представлены в таблице 1. После акустомикроскопических исследований глаза были энуклеированы и из них выделялись склеры для дальнейших испытаний.

Исследование механических свойств образцов склер проводили на универсальной испытательной машине производства фирмы Инстрон (США) модель 5965, укомплектованной датчиком нагрузки ± 50 Н (серия 2530). Испытания проводили в режиме одноосного растяжения на прямоугольных образцах. Длина рабочей части образца 3 мм, ширина 4 мм. Образцы склер для механических испытаний вырезались таким образом, чтобы в исследуемую область на включались участки с гребешком, т.к. механические свойства этих участков сильно отличаются от остальной склеры и могут оказывать влияние на результат эксперимента как концентраторы напряжения. Скорость испытаний составляла 6 мм/мин. Преднагрузка была 0,02 Н. Испытания проводили на воздухе при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Статистическая выборка выполнена по пяти образцам.

По полученным в результате испытаний деформационным кривым (рис. 2) в координатах напряжение – деформация определяли основные механические параметры: прочность, модуль упругости, деформацию разрушения (табл. 2).

Таблица 1. Определение толщины склеры перепела с помощью акустической микроскопии *in situ*

Тип освещения	Возраст, сутки	Толщина склеры, мкм
Красный	10	145 ± 10
	23	140 ± 10
Синий	10	150 ± 10
	23	120 ± 10
Естественный (контроль)	65	180 ± 10

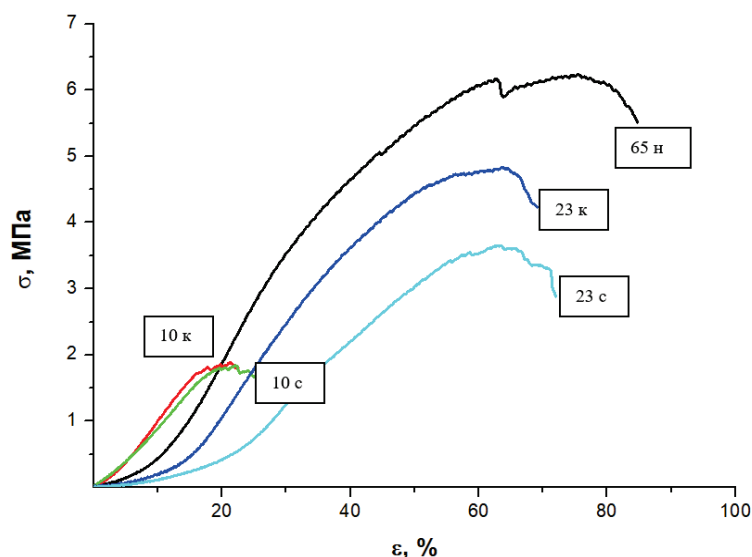


Рисунок 2. Типичные кривые деформации склер перепела: 10 к – 10 суток при красном освещении, 10 с – 10 суток при синем освещении, 23 к – 23 суток при красном освещении, 23 с – 23 суток при синем освещении, 65 н – 65 суток при естественном освещении (норма)

Результаты механических испытаний были проинтерпретированы в рамках модели высокоэластичности, основанной на не-Гауссовой статистике [7]. Эта двухпараметрическая модель представляет полимерную сетку как совокупность кубических элементов, в геометрическом центре каждого из которых находится узел. От узла в вершины куба отходят 8 цепей (поэтому часто эти модели называют «8-ми цепочечными»). Определяемыми параметрами являются: количество 8-ми цепочечных элементов (N_8) и начальный модуль сдвига (μ_0) (табл. 2). Показано, что на ранних этапах (10-ые сутки) формируется жесткий каркас внеклеточного матрикса, обладающий небольшим количеством узлов (N_8), дальнейший рост склеры (до 23-х суток) сопровождается увеличением количества узлов, однако, начальный модуль сдвига, характеризующий жесткость соединяющих их эластических сегментов, падает. Можно предположить, что это отражает процесс формирования высокоэластической сетки неколлагеновых гликопротеинов и протеогликанов, связывающей в единую систему пластины фибриллярного коллагена [8-10]. В тоже время, характеристики модуля упругости и прочности, показывают стабильность жесткого коллагенового каркаса при красном освещении и его изменение при синем освещении.

При развитии глаза в условиях естественного освещения 65-ым суткам происходит рост жесткости высокоэластической сетки, соединяющей коллагеновые пластины, и количество узлов сшивки.

Полученные данные (табл. 1 и 2) свидетельствуют о том, что формирование склеры в ранний постнатальный период может зависеть от спектрального состава повседневного освещения. Так, у 23-суточных цыплят перепела при повседневном синем освещении толщина склеры несколько снижена в сравнении с красным освещением ($\Delta 14\%$), в сочетании со снижением ее эластичности и прочности ($\Delta 7\%$). Таким образом, показано, что спектральный состав освещения оказывает влияние на физико-механические свойства матрикса склеры. Предполагаются дальнейшие исследования влияния спектрального состава освещения на формирование глаза в раннем постнатальном периоде рамках задач по моделированию детской миопии.

Список литературы / References:

1. Summers Rada J., Shelton S., Norton T. The sclera and myopia. *Experimental Eye Research*, 2006, vol. 82, pp. 185-200.
2. Wisely C., Sayed J., Tamez H., Zelinka C., Abdel-Rahman M., Fischer A., Cebulla C. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *J. Prog Retin Eye Res*, 2017, vol. 61, pp. 72-97.

Таблица 2. Физико-механические характеристики склер перепела

	Возраст, сутки	N_8	μ_0 , МПа	E , МПа	σ_p , МПа	ϵ_p , %
красный	10	9,170	0,058	11,6 $\pm$ 2,8	1,86 $\pm$ 0,64	22 $\pm$ 2
	23	9,428	0,041	12,4 $\pm$ 2,1	4,06 $\pm$ 0,84	65 $\pm$ 5
синий	10	9,289	0,093	11,3 $\pm$ 3,2	1,83 $\pm$ 0,15	21 $\pm$ 4
	23	9,370	0,038	8,7 $\pm$ 0,6	3,31 $\pm$ 0,96	55 $\pm$ 9
контроль	65	9,452	0,105	20,4 $\pm$ 5,1	5,98 $\pm$ 1,57	53 $\pm$ 14

3. Ostrin L. Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure. *Clin. Exp. Opt.*, 2019, vol. 102, pp. 99-108.
4. Sereznikova N., Pogodina L., Lipina T., Trofimova N., Gurieva T., Zak P. Age-related adaptive responses of mitochondria of the retinal pigment epithelium to the everyday blue LED lighting. *Doklady Biological Sciences*, 2017, vol. 475, no. 1, pp. 141-143.
5. Rucker F. Monochromatic and white light and the regulation of eye growth, *Exp. Eye Res.*, 2019, vol. 184, pp. 172-182.
6. Khramtsova E.A., Zak P.P., Petronyuk J.S., Trofimova N.N., Krashennnikov S.V., Titov S.A., Gurieva T.S., Dadasheva O.A., Grigoriev T.E., Levin V.M. Light induced myopia in Japanese quail chicks by acoustic microscopy. *Proceedings of VII International Conference AIS-2020*, in press.
7. Elias-Zuniga A. A non-Gaussian network model for rubber elasticity. *Polymer*, 2006, vol. 47, pp. 907-914.
8. Fratzl P. (eds), *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer, Boston, 2008, pp. 359-397.
9. Khramtsova E., Morokov E., Lukanina K., Grigoriev T., Petronyuk Y., Shepelev A., Gubareva E., Kuevda E., Levin V., Chvalun S. Impulse acoustic microscopy: A new approach for investigation of polymer and natural scaffolds. *Polymer Engineering and Science*, 2017, vol. 57, no. 7, pp. 709-715.
10. Morokov E., Khramtsova E., E. Kuevda, Gubareva E., Grigoriev T., Lukanina K., Levin V. Noninvasive ultrasound imaging for assessment of intact microstructure of extracellular matrix in tissue engineering. *Artif Organs*, 2019, vol. 43, no. 11, pp. 1104-1110.

THE INFLUENCE OF ILLUMINATION SPECTRA ON SCLERA PHYSICO-MECHANICAL PROPERTIES ON JAPANESE QUAIL CHICK MODEL

Khramtsova E.A.¹, Krashennnikov S.V.², Petronyuk Y.S.¹, Trofimova N.N.¹, Gurieva T.S.³, Dadasheva O.A.³, Levin V.M.¹, Grigoriev T.E.², Zak P.P.¹

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences
Kosygin st., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: alyonushk@gmail.com

² National Research Centre "Kurchatov Institute"
Akademika Kurchatova pl. 1, Moscow, 123182, Russia

³ Research Center Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences
Khoroshevskoe Shosse, 76a, Moscow, 123007, Russia

Abstract. The research presents preliminary data about influence of everyday illumination spectra on the postnatal development of the sclera (blue light - 450 nm; long-wave red light - 630 nm and daylight for the control group). Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica dom.*) are widely used animal model for studying of eye development structures and various eye disorders. The thickness of sclera was studied by non-invasive methods using scanning impulse acoustic microscopy, which allows to take measurements with minimal distortion *in situ*. After the sclera was isolated, mechanical tests were carried out and the main physico-mechanical characteristics were determined. It was shown that on the 23rd day of postnatal development in blue light conditions the decrease in the thickness of the sclera ($\Delta 14\%$) is observed in combination with a decrease in its elasticity ($\Delta 7\%$). Interpretation of mechanical test results was made via a model of high elasticity based on non-Gaussian statistics that estimates the locations of the main structural elements of the sclera (extracellular matrix). The model revealed some features of the sclera development under different spectral illumination. The work was performed as part of the tasks of kid's myopia modeling.
Key words: sclera, quail, extracellular matrix, ultrasound microscopy, physico-mechanical characteristics, native tissue.

НЕЙРОЛЕПТИК ТРИФЛУОПЕРАЗИН ПОДАВЛЯЕТ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

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

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова

ул. Академика Лебедева, 6, г. Санкт-Петербург, 194044, РФ

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. Кожа лягушки – классический модельный объект для изучения механизмов трансэпителиального транспорта ионов. Ранее нами было обнаружено, что транспорт Na^+ в коже лягушки модулируется различными окисляющими и восстанавливающими агентами. При этом впервые показано, что окисленный глутатион (GSSG) и препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла, «ФАРМА–ВАМ», Санкт-Петербург), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ . Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, широко экспрессированные в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов. Ранее нами было показано, что лиганд рецепторов сигма-1 нейрорептиг трифлуоперазин (ТФП) подавляет транспорт Na^+ в коже лягушки. В то же время известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения иммуномодуляторов и нейрорептигов. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали лиганд рецепторов сигма-1 – нейрорептиг фенотиазинового ряда ТФП. С использованием метода фиксации потенциала на эпителии кожи лягушки впервые показано, что 20 мкг/мл ТФП, приложенный с апикальной или базолатеральной поверхности кожи, снижает стимулирующее влияние 100 мкг/мл глутоксима на транспорт Na^+ . Результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в сигнальных каскадах, запускаемых глутоксимом в эпителии кожи лягушки и приводящих к стимуляции транспорта Na^+ , и указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препарата глутоксим и производных фенотиазина.

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

ВВЕДЕНИЕ

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев [1], что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. Различные белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса. Ранее нами было обнаружено, что транспорт Na^+ в коже лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется различными окисляющими и восстанавливающими агентами, такими как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG) и препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла; «ФАРМА – ВАМ», Санкт-Петербург), приложенными к апикальной или базолатеральной поверхности кожи [2]. Обнаружено, что добавление этих окислителей со стороны апикальной поверхности кожи ингибирует транспорт Na^+ . В то же время, при добавлении агентов со стороны базолатеральной поверхности кожи, только цистин и цистамин сохраняли своё ингибирующее действие, тогда как GSSG и глутоксим имитировали действие инсулина и стимулировали трансэпителиальный транспорт Na^+ . В дальнейшем, с использованием широкого спектра фармакологических агентов, нами было впервые показано, что в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки принимают участие различные структурные элементы клетки и компоненты многих сигнальных систем. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия глутоксима на транспорт Na^+ , во многом еще не ясны.

Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикула на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических

тканях, в том числе в клетках почки и печени [3, 4]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [5]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [6, 7]. Ранее нами было показано, что лиганд рецепторов сигма-1 нейрорепептик трифлуоперазин (ТФП) подавляет транспорт Na^+ в коже лягушки [8]. В то же время известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения иммуномодуляторов и нейрорепептиков. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали антагонист сигма-1 рецепторов – нейрорепептик фенотиазинового ряда ТФП [9].

МЕТОДИКА

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

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 38,2 \pm 4,2$ мкА; $V_{OC} = -79,2 \pm 11,0$ мВ; $g_T = 1,7 \pm 0,6$ мСм.

Показано, что глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, подобно инсулину стимулирует транспорт Na^+ . После приложения глутоксима, I_{SC} возрос на $39,2 \pm 7,4$ %; V_{OC} – на $50,1 \pm 9,0$ %; величина g_T не изменилась (здесь и далее по тексту $M \pm m$, n (число опытов) = 10).

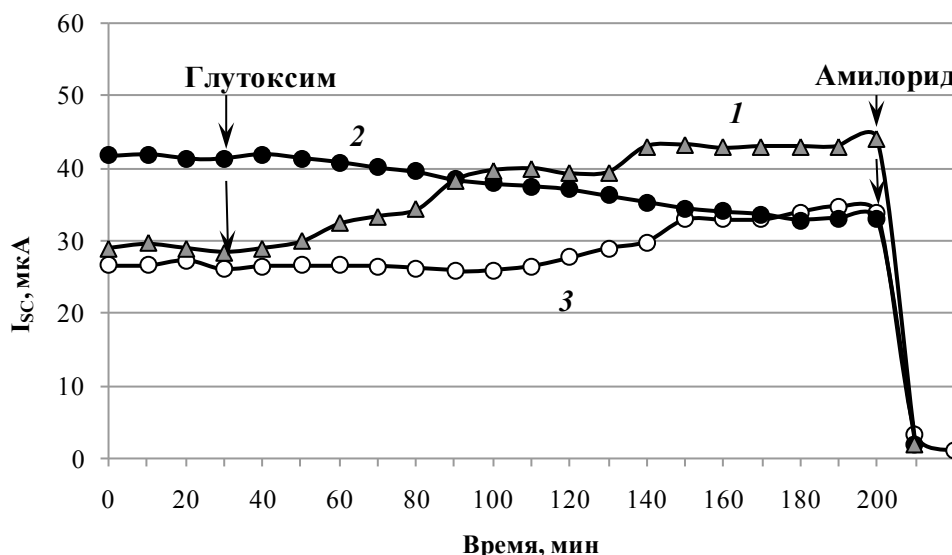


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима и лиганда рецепторов сигма-1 – ТФП. (1) – I_{SC} после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной кожи; (2) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 20 мкг/мл ТФП, приложенного со стороны апикальной поверхности кожи; (3) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 20 мкг/мл ТФП, приложенного со стороны базолатеральной поверхности кожи. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

Обнаружено, что ТФП снижает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ . В среднем, после обработки апикальной или базолатеральной поверхности кожи ТФП (20 мкг/мл) в течение 30 мин перед приложением к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл глутоксима, I_{sc} уменьшается на $12,4 \pm 3,5$ или увеличивается на $6,4 \pm 2,1$ %, V_{oc} уменьшается на $30,0 \pm 8,1$ или увеличивается на $5,5 \pm 1,1$ %, а g_{T} увеличивается на $10,1 \pm 3,1$ % или не изменяется, при приложении ТФП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

Обнаружено также, что степень ингибирующего действия ТФП на эффект глутоксима на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения ТФП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1). Результаты, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о том, что ТФП значительно сильнее снижает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ при действии агента со стороны апикальной поверхности кожи лягушки. Так, приложение ТФП к апикальной поверхности кожи вызывает не только полное подавление стимулирующего действия глутоксима на транспорт Na^+ , но и приводит к снижению транспорта Na^+ в коже лягушки (рис. 1, кривая 2). Тогда как предварительная обработка базолатеральной поверхности кожи ТФП вызывает снижение, но не подавление стимулирующего действия глутоксима (рис. 1, кривая 3).

Транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+ -транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах клетки. Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [10, 11]. Однако введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление I_{sc} (рис. 1), что свидетельствует о том, что влияние глутоксима на транспорт Na^+ связано, преимущественно, с модуляцией активности ENaC .

Результаты, представленные в настоящей работе, согласуются с данными, полученными нами ранее при сравнительном исследовании участия в регуляции иммуномодулятором глутоксимом транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки двух структурно различных антагонистов сигма-1 рецепторов – нейролептика фенотиазинового ряда хлорпромазина и производного бутирофенона – галоперидола. Хлорпромазин (аминазин), также как и ТФП, относится к первому поколению типичных нейролептиков фенотиазинового ряда, широко применяемых в качестве антипсихотических, миорелаксирующих, седативных средств, а также для лечения шизофрении и других психических заболеваний [12]. Нами было показано, что хлорпромазин значительно сильнее снижает стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ . Кроме того, ингибирующий эффект галоперидола и хлорпромазина более выражен при действии агентов со стороны апикальной поверхности кожи лягушки [13]. Таким образом, результаты, представленные в настоящей работе и ранее, позволяют предположить, что влияние лигандов сигма-1 рецепторов на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным или базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток, а также свидетельствуют о том, что различные производные фенотиазина (хлорпромазин и ТФП) обладают сходным влиянием на I_{sc} и эффект глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки.

Полученные нами результаты согласуются также с данными литературы. Так, в последнее время появляются данные о том, что рецепторы сигма-1 модулируют активность ионных каналов различных типов, в том числе протон-активируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ ENaC , к которому принадлежат и ENaC . Обнаружено, что возможно как прямое взаимодействие между рецепторами сигма-1 и ASICs, с образованием комплекса со стехиометрией 1 сигма-1 рецептор/1 субъединица ASIC [14], так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов сигма-1 рецепторов на ASICs, при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как гетеротримерные G- белки и комплекс кальцинеина с адаптерным белком AKAP150 [15]. Полученные нами данные о том, что ингибирующее влияние ТФП на эффект глутоксима значительно более выражено при добавлении ТФП со стороны апикальной поверхности кожи, позволяют предположить, что основные мишени для действия лигандов рецепторов сигма-1 локализованы именно в апикальных, а не в базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки.

Таким образом, в настоящей работе впервые на эпителии кожи лягушки показано, что лиганд рецепторов сигма-1 – нейролептик фенотиазинового ряда ТФП модулирует влияние глутоксима на транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в сигнальных каскадах, запускаемых глутоксимом в эпителии кожи лягушки, и приводящих к стимуляции транспорта Na^+ . Полученные нами данные о влиянии трифлуоперазина способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенотиазина, а также указывают на нежелательность совместного применения в клинической практике препарата глутоксим и производных фенотиазина.

Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*. L.: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide containing compounds on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Akad. Nauk*, 2008, vol. 421, № 5, pp. 709-712.
3. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σRs]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal. Trans.*, 2016, vol. 36, pp. 327-388.

4. Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., Orringer J., Williams W., Bowen W.D. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, vol. 268, pp. 9-18.
5. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.*, 2008, vol. 6, pp. 344-366.
6. Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.*, 2018, vol. 16, pp. 97-116.
7. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organellar signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, vol. 31, pp. 557-566.
8. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Трифлуоперазин модулирует транспорт Na^+ в коже лягушки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 1, с. 90-93. [Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I. Trifluoperazine modulates Na^+ transport in frog skin. *Russ. J. Biol. Phys. Chem.*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 90-93. (In Russ.)]
9. Schuster D.I., Arnold F.J., Murphy R.B. Purification, pharmacological characterization and photoaffinity labeling of sigma receptors from rat and bovine brain. *Brain Res.*, 1995, vol. 670, pp. 14-28.
10. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.
11. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelial sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.
12. Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H. Binding of umespirone to the sigma receptor: evidence for multiple affinity states. *Neuropharmacol.*, 1990, vol. 29, pp. 181-184.
13. Крутецкая З.И., Мельницкая А.В., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Антагонисты рецепторов сигма-1 галоперидол и хлорпромазин модулируют влияние глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. *ДАН*, 2019, т. 484, № 5, с. 629-632. [Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdachev A.D. Sigma-1 receptor antagonists haloperidol and chlorpromazine modulate the effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2019, vol. 484, pp. 63-65. (In Russ.)]
14. Carnally S.M., Johannessen M., Henderson R.M., Jackson M.B., Edwardson J.M. Demonstration of a direct interaction between σ -1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys. J.*, 2010, vol. 98, pp. 1182-1191.
15. Herrera Y., Katnik C., Rodriguez J.D., Hall A.A., Willing A., Pennypacker K.R., Cuevas J. Sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca^{2+} influx in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, vol. 327, pp. 491-502.

NEUROLEPTIC TRIFLUOPERAZINE ATTENUATES STIMULATORY EFFECT OF IMMUNOMODULATOR GLUTOXIM ON Na^+ TRANSPORT IN FROG SKIN

Melnitskaya A.V.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹

¹ Saint-Petersburg State University

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

² Kirov Medical Academy

Lebedeva str., 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia

Abstract. The skin of amphibians is a classic model object for the study of transepithelial ion transport mechanisms. Previously, we found that Na^+ transport in frog skin epithelial cells is modulated by oxidizing and reducing agents. For the first time we showed that oxidized glutathione (GSSG) and drug glutoxim® (disodium salt of GSSG with a nano additive of a d-metal, PHARMA-VAM, Saint-Petersburg), mimic insulin effect and stimulate transepithelial Na^+ transport when applied to the frog skin basolateral surface. Sigma-1 receptors are unique ligand-regulated molecular chaperones widely expressed in central nervous system and in peripheral tissues, including kidney and liver cells. Sigma-1 receptors interact with target proteins, including ion channels and receptors, and modulate many cellular processes. We have previously shown that sigma-1 receptor ligand neuroleptic trifluoperazine (TFP) inhibits Na^+ transport in frog skin. It is known that some of the clinical cases require concomitant use of immunomodulators and neuroleptics. Thus, it was appropriate to study the involvement of sigma-1 receptors in glutoxim effect on Na^+ transport in frog skin. Phenothiazine derivative neuroleptic TFP, the ligand of sigma-1 receptor, was used in our experiments. Using voltage-clamp technique, we have shown for the first time that frog skin preincubation with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TFP attenuates the stimulatory effect of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ glutoxim on Na^+ transport. The results indicate the involvement of sigma-1 receptors in signaling cascades triggered by glutoxim in frog skin epithelium and leading to Na^+ transport stimulation and also suggest that a combined use of drug glutoxim and phenothiazine derivatives in clinical practice is undesirable.

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

КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ МЕТОДОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ И БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОЦЕНКЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПАТОЛОГИИ ТРЕТЬЕГО ТРИМЕСТРА БЕРЕМЕННОСТИ

Золотавина М.Л.

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: zolotavina_m@mail.ru

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация: В статье рассматривается корреляционный анализ между показателями биохимических методов (общий белок, билирубин, АЛТ, АСТ, глюкоза, мочевины, креатинин, холестерин, щелочная фосфатаза) и метода функциональной диагностики: метод доплерометрии (СДО СМА, ПА, ЛМА, ПМА), используемых при постановке диагноза и сопровождении развитии патологического процесса фетоплацентарная недостаточность и железодефицитная анемия, осложненные нарушением гемодинамики и без нее) и у беременных в третьем триместре.

Ключевые слова: физико-химические методы, метод доплерометрии, фетоплацентарная недостаточность, железодефицитная анемия.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на стремительное развитие перинатальной медицины, проблема выбора методов диагностики остается актуальной, особенно при патологиях беременности, где частота развития фетоплацентарной недостаточности (ФПН) достигает 45% [1], а железодефицитной анемии (ЖДА) – 20%. Данные патологии негативно влияют на плод, могут вызывать ишемию мозга плода, задержку роста и развития ребёнка. Существующая в настоящее время диагностика патологий беременности основана, преимущественно на функциональных методах, а в литературе отсутствуют данные о взаимосвязи биохимических и функциональных показателей крови. Хотя, определение взаимосвязи между морфологическими и биохимическими показателями позволило бы расширить представления о патогенезе данных нарушений, дополнить имеющиеся критерии диагностики, способствующие более раннему обнаружению патологий.

Исследования были проведены на базе клинко-диагностической лаборатории МБУЗ Родильного дома города Краснодара в период с июня по ноябрь 2019 года. Материалом исследования служили сыворотка крови и доплерометрические данные беременных женщин с ФПН и ЖДА, данными патологиями, осложнёнными нарушениями гемодинамики (НГ), и женщин группы контроля с физиологической беременностью.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Определение общего белка, билирубина, АЛТ, АСТ, глюкозы, мочевины, креатинина, холестерина, ЩФ в сыворотке крови беременных женщин, имеющих такие патологии третьего триместра беременности как ФПН и ЖДА, а также данные патологии, осложнённые нарушениями гемодинамических процессов разной степени тяжести, выполнялось на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab 20», с использованием готовых реактивов производства «Thermo Fisher Scientific». Определение уровня Hb проводилось на автоматическом гематологическом анализаторе «Beckman Coulter LH 500», с использованием готовых реактивов производства «Beckman Coulter». Определение СДО СМА, ПА, ЛМА, ПМА проводились на оборудовании Siemens Acuson NX3.

Для получения правомерного заключения по материалам исследований была проведена статистическая обработка результатов. Определение достоверности разницы между исследуемыми значениями проводились с помощью критерия Стьюдента при 5% и 1% уровне значимости на персональном компьютере при помощи пакета программ «Microsoft Office 2010». Определение достоверности, направления и силы связи между исследуемыми показателями проводилось с помощью корреляционно-регрессионного анализа (коэффициента Пирсона) на персональном компьютере при помощи пакета программ «Microsoft Office 2010».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования, для решения поставленных задач, женщины с ФПН и ЖДА были разделены на три возрастные группы – А1 (18-25 лет), А2 (26-35 лет), А3 (36-40 лет), по такому же принципу были разделены женщины группы контроля (В1, В2, В3). По мнению Коваленко М.С. [4] периодом, наиболее благоприятным для вынашивания ребёнка, является возраст от 18 до 35 лет. Периодом так называемой «физиологической незрелости» считают возраст моложе 18 лет, в это время формируются основы образа жизни, стиль поведения, что в дальнейшем определяет физическое и психическое здоровье роженицы. Кроме того, беременность женщин, входящих в старшую возрастную группу (от 35 лет) принято считать первично патологической, так как она зачастую сопровождается большим риском осложнений, как со стороны роженицы, так и со стороны плода [10].

Таблица 1. Возрастные особенности и нозологические формы патологий третьего триместра беременности

Экспериментальные группы	Патология	Количество женщин по подгруппам (чел)	Количество человек в группе (чел)
A1 (18-25 лет)	Фетоплацентарная недостаточность	11	47
A2 (26-35 лет)		26	
A3 (36-40 лет)		10	
A1 (18-25 лет)	Железодефицитная анемия	11	44
A2 (26-35 лет)		23	
A3 (36-40 лет)		10	
1А (нарушение маточно-плацентарного кровотока)	Фетоплацентарная недостаточность, осложнённая нарушениями гемодинамики	8	17
1Б (нарушение плодово-плацентарного кровотока)		5	
2 (одновременное нарушение кровотоков)		4	
1А (нарушение маточно-плацентарного кровотока)	Железодефицитная анемия, осложнённая нарушениями гемодинамики	4	12
1Б (нарушение плодово-плацентарного кровотока)		5	
2 (одновременное нарушение кровотоков)		3	
Контрольная группа			40
Всего			160

Женщины с осложнёнными формами данных патологий были разделены на группы соответственно степени НГ. Установлено, что частота формирования ФПН составила 12%, ЖДА – 11%, частота развития осложнений, в виде НГ составила 4 и 3% соответственно. Чаще всего эти патологии развиваются в возрасте 26-35 лет, реже – в 36-40 лет. Для ФПН характерно развитие 1А степени НГ, для ЖДА – 1Б, реже всего при данных патологиях НГ переходят во вторую степень. Данные представлены в таблице 1.

Далее нами были проанализированы изменения биохимических показателей крови при исследуемых патологиях.

Так, при ФПН уровень общего белка снижался. По мнению Меньшикова В.В. [6] при беременности объём циркулирующей крови возрастает в большей степени, чем количество белков плазмы, поэтому развивается гипопроотеинемия, активность ЩФ повышалась более чем в два раза. При наличии ФПН уровень активности ЩФ выше чем, при физиологической беременности и повышается пропорционально степени ФПН [7], наблюдалась незначительная гиперхолестеринемия. Данные представлены в таблице 2.

При ЖДА были выявлены незначительная гипопроотеинемия. Железодефицитная анемия сопровождается нарушениями белкового обмена с возникновением дефицита белков в организме [9], снижение уровня глюкозы в группах А1, А2 и незначительное повышение в группе А3, снижение концентрации мочевины во всех экспериментальных группах. Согласно данным А.А. Кишкуна [3], беременность приводит к увеличению скорости клубочковой фильтрации, и, как следствие, скорость выведения мочевины также повышается, установлена незначительная гиперхолестеринемия, возможно, это связано с тем, что эстрогены, вырабатываемые во время беременности, оказывают ингибирующее действие на липазу, следствием этого является увеличение концентраций липидных фракций [5]. Активность ЩФ превышала контрольные значения более чем в два раза, снижение уровня гемоглобина. Уровень Hb является диагностическим критерием ЖДА.

Таблица 2. Биохимические показатели сыворотки крови беременных женщин, имеющих в анамнезе фетоплацентарную недостаточность

Исследуемые группы	Показатель($\bar{x} \pm m$); p								
	Общий белок г/л	Билирубин общий моль/л	АЛТ МЕ/л	АСТ МЕ/л	Глюкоза ммоль/л	Мочевина ммоль/л	Креатинин мкмоль/л	Холестерин ммоль/л	Щелочная фосфатаза Ед/л
A1	61,1 $\pm$ 0,8*	8,4 $\pm$ 1,4	20,9 $\pm$ 4,5	19,5 $\pm$ 3,2	5,2 $\pm$ 1,1	4,9 $\pm$ 1,1	65,5 $\pm$ 3,7	6,4 $\pm$ 0,5*	255,3 $\pm$ 32,4
A2	61,7 $\pm$ 1,2*	6,8 $\pm$ 0,9	18,1 $\pm$ 2,4	18,4 $\pm$ 2,3	4,4 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,2*#	65,2 $\pm$ 1,9*	5,9 $\pm$ 0,2*	344,8 $\pm$ 31,5
A3	60,2 $\pm$ 2,9	7,0 $\pm$ 1,2	28,9 $\pm$ 9,2	25,8 $\pm$ 4,8	4,2 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,4	74,7 $\pm$ 4,9	6,1 $\pm$ 0,6*	343,4 $\pm$ 26,1
B1	73,9 $\pm$ 1,8	7,2 $\pm$ 1,3	11,9 $\pm$ 1,7	17,7 $\pm$ 2,2	4,5 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,4	61,3 $\pm$ 3,1	4,6 $\pm$ 0,3	153,9 $\pm$ 12,6
B2	68,4 $\pm$ 0,8	14,3 $\pm$ 3,7	24,9 $\pm$ 6,5	21,6 $\pm$ 1,0	4,6 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	58,3 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,3	163,2 $\pm$ 15,9
B3	67,4 $\pm$ 1	8,4 $\pm$ 1,2	13,4 $\pm$ 1	23,1 $\pm$ 3,2	4,1 $\pm$ 0,3	5 $\pm$ 0,3	61,1 $\pm$ 3,0	4,6 $\pm$ 0,3	162,9 $\pm$ 14,9
Реф-тные значения	62,0-71,0	3,4-17,1	7,0-40,0	10,0-30,0	3,8-5,0	4,0-7,2	53,0-97,0	3,6-6,2	75,0-275,0

Примечание:

1 - * значимость различий между показателями контрольной и экспериментальной групп $p \leq 0,05$,2 - # значимость различий показателей между возрастными группами $p \leq 0,05$ (A1-A2, A2-A3, A3-A1)

Согласно критериям Всемирной организации здравоохранения концентрация Hb в крови 70-99 г/л соответствует умеренно выраженной анемии [2]. Помимо этого, снижение уровня данного показателя связано с увеличением объёма плазмы – физиологическим явлением, характерным для беременности [3]. Данные представлены в таблице 3.

Далее были проанализированы изменения биохимических показателей сыворотки крови у женщин с патологиями, осложнёнными НГ, в группу контроля К вошли женщины, имеющие в анамнезе неосложнённые патологии (табл. 4, 5).

При ФПН, осложнённой НГ, наблюдаются следующие изменения биохимических показателей сыворотки крови: незначительная гипопроотеинемия в группе 1Б, повышение активности АЛТ более чем в полтора в

Таблица 3. Биохимические показатели сыворотки крови беременных женщин, имеющих в анамнезе железодефицитную анемию

Исследуемые группы	Показатель($\bar{x} \pm m$); p									
	Общий белок г/л	Билирубин общий моль/л	АЛТ МЕ/л	АСТ МЕ/л	Глюкоза ммоль/л	Мочевина ммоль/л	Креатинин мкмоль/л	Холестерин ммоль/л	Щелочная фосфатаза Ед/л	Гемоглобин г/л
A1	60,9 $\pm$ 2,2	11,9 $\pm$ 2,2	14,3 $\pm$ 2,8	20,6 $\pm$ 2,3	4,0 $\pm$ 0,2*#	3,2 $\pm$ 0,4*	67,2 $\pm$ 2,8	5,9 $\pm$ 0,4*	357,0 $\pm$ 37,6	94,4 $\pm$ 3,8
A2	59,3 $\pm$ 1,2*	6,5 $\pm$ 0,7	15,0 $\pm$ 1,5	21,9 $\pm$ 1,8	4,1 $\pm$ 0,2*#	3,9 $\pm$ 0,3	68,4 $\pm$ 2,4	6,0 $\pm$ 0,5*	324,6 $\pm$ 22,0	99,9 $\pm$ 1,3*
A3	60,9 $\pm$ 1,4*	7,7 $\pm$ 0,7	27,6 $\pm$ 9,7	30,7 $\pm$ 5,3	4,5 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,5	67,5 $\pm$ 6,4	6,7 $\pm$ 0,9	342,3 $\pm$ 40,1	101,4 $\pm$ 2,6
B1	73,9 $\pm$ 1,8	7,2 $\pm$ 1,3	11,9 $\pm$ 1,7	17,7 $\pm$ 2,2	4,5 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,4	61,3 $\pm$ 3,1	4,6 $\pm$ 0,3	153,9 $\pm$ 12,6	117,5 $\pm$ 1,9
B2	68,4 $\pm$ 0,8	14,3 $\pm$ 3,7	24,9 $\pm$ 6,5	21,6 $\pm$ 1,0	4,6 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	58,3 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,3	163,2 $\pm$ 15,9	120,6 $\pm$ 1,7
B3	67,4 $\pm$ 1	8,4 $\pm$ 1,2	13,4 $\pm$ 1	23,1 $\pm$ 3,2	4,1 $\pm$ 0,3	5 $\pm$ 0,3	61,1 $\pm$ 3,0	4,6 $\pm$ 0,3	162,9 $\pm$ 14,9	119,3 $\pm$ 2,1
Реф-тные значения	62,0-71,0	3,4-17,1	7,0-40,0	10,0-30,0	3,8-5,0	4,0-7,2	53,0-97,0	3,6-6,2	75,0-275,0	112,0-130,0

Примечание:

1 - *значимость различий между показателями контрольной и экспериментальной групп $p \leq 0,05$,2 - #значимость различий показателей между возрастными группами $p \leq 0,05$ (A1-A2, A2-A3, A3-A1)**Таблица 4.** Биохимические показатели сыворотки крови беременных женщин с осложнённой и неосложнённой фетоплацентарной недостаточностью

Исследуемые группы	Показатель($\bar{x} \pm m$); p								
	Общий белок г/л	Билирубин общий моль/л	АЛТ МЕ/л	АСТ МЕ/л	Глюкоза ммоль/л	Мочевина ммоль/л	Креатинин мкмоль/л	Холестерин ммоль/л	Щелочная фосфатаза Ед/л
1А	55,8 $\pm$ 2,7	9,1 $\pm$ 2,6	32,4 $\pm$ 11,9	24,5 $\pm$ 5,1	4,4 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2*	65,4 $\pm$ 2,6	6,5 $\pm$ 0,4	344,6 $\pm$ 33,0
1Б	62,2 $\pm$ 1,3	6,4 $\pm$ 1,5	21,3 $\pm$ 7,6	24,8 $\pm$ 2,8	4,2 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,8	61,4 $\pm$ 2,3	7,0 $\pm$ 0,3*	310,9 $\pm$ 58,1
2	62,5 $\pm$ 2,3	8,1 $\pm$ 3,3	14,5 $\pm$ 4,3	16,4 $\pm$ 2,3	4,5 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,6	72,4 $\pm$ 7,3	6,3 $\pm$ 0,6	456,9 $\pm$ 27,6
К	61,2 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 0,6	21,0 $\pm$ 2,5	20,2 $\pm$ 1,8	4,5 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,3	67,3 $\pm$ 1,7	6,1 $\pm$ 0,2	323,6 $\pm$ 19,9
Рефер-ные значения	62,0-71,0	3,4-17,1	7,0-40,0	10,0-30,0	3,8-5,0	4,0-7,2	53,0-97,0	3,6-6,2	75,0-275,0

Примечание: *- значимость различий между показателями контрольной и экспериментальной групп $p \leq 0,05$

Таблица 5. Биохимические показатели сыворотки крови беременных женщин с осложнённой и неосложнённой железодефицитной анемией

Исследуемые группы	Показатель($\bar{x} \pm m$); г									
	Общий белок г/л	Билирубин общий моль/л	АЛТ МЕ/л	АСТ МЕ/л	Глюкоза ммоль/л	Мочевина ммоль/л	Креатинин мкмоль/л	Холестерин ммоль/л	Щелочная фосфатаза Ед/л	Гемоглобин г/л
1А	62,3±5,3	8,1±2,7	12,2±3,3	19,1±2,1	4,3±0,3	3,0±0,2*	67,7±7,2	5,7±0,4	301,1±49,8	106,5±5,2
1Б	55,1±2,3	7,5±2,6	12,1±1,8	24,2±2,2	4,0±0,2	4,1±0,9	73,7±5,3	4,8±0,2*	388,4±19,2	96,4±1,4
2	61,0±2,8	7,0±2,1	15,3±4,5	15,1±1,9	4,1±0,5	4,6±2,1	62,2±5,1	6,0±1,4	284,9±108,9	100,0±2,5
К	60,1±0,8	8,2±0,7	17,7±2,4	23,6±1,6	4,2±0,1	3,8±0,2	67,9±1,9	6,2±0,3	336,7±16,5	100,1±1,2
Референтные значения	62,0-71,0	3,4-17,1	7,0-40,0	10,0-30,0	3,8-5,0	4,0-7,2	53,0-97,0	3,6-6,2	75,0-275,0	112,0-130,0

Примечание: * - значимость различий $\leq 0,05$

экспериментальной группе 1А и снижение в полтора раза в группе 2, некоторое снижение уровня глюкозы в группах 1А и 1Б и незначительное повышение в группе 2, незначительная гиперхолестеринемия, повышение активности ЩФ в полтора раза в группе нарушений 2.

При ЖДА, осложнённой НГ были отмечены гипопроотеинемия, некоторое снижение уровня глюкозы, гипоуремия в группе 1А, некоторое снижение уровня холестерина во всех исследуемых группах, повышение активности ЩФ в группе 1Б, снижение уровня Нв в группах 1Б и 2.

В ходе дальнейшего статистического анализа (табл. 6) были выявлены следующие корреляционные связи: между показателями СДО СМА и общего белка в группе НГ 1Б; данным биохимическим показателем и СДО ПМА группе 2; между показателями СДО ЛМА и мочевины в группе 2; между показателями СДО ПМА и глюкозы, в группе НГ 1Б степени. Для патологий, не осложнённых НГ, не выявлено сильных корреляционных связей между биохимическими и функциональными показателями крови. Следует отметить, что в качестве отличительных диагностических критериев в сопровождении формирования ФПН, осложнённой НГ могут применяться общий белок, креатинин, в случае ЖДА, осложнённой НГ – билирубин и холестерин.

Возможно, связь между концентрацией общего белка и физиологическими критериями оценки состояния гемодинамики обусловлена снижением содержания белка в организме в ходе изменения проницаемости сосудов, и перераспределения жидкости и белка в межклеточном пространстве [5], что приводит к изменению коллоидно-онкотического давления плазмы крови и, как следствие, к нарушению гемодинамики.

Что касается креатинина, то известно, что доля продуктов азотистого обмена в поддержании онкотического давления крови небольшая [8], но на фоне гипопроотеинемии, развивающейся при патологиях беременности, осложнённых НГ, снижение и этого показателя, возможно, свидетельствует о серьёзных сдвигах коллоидно-онкотического давления крови.

Возможно, изменения качественного липидного состава сыворотки крови приводит к нарушениям структуры и функции цитоплазматических мембран трофобласта, также меняется равновесие между перекисным окислением липидов и антиоксидантной защитой в организме матери и плода. Предположительно, свободные радикалы, образующиеся могут приводить к ингибированию простаглицлина и оксида азота (эндотелиальные факторы релаксации), отвечающим за спастические реакции сосудов [1], что и способствует нарушению гемодинамики в система мать-плацента-плод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования были рассмотрены изменения биохимических показателей женщин, имеющих патологии в третьем триместре беременности, а также проведён корреляционно-регрессионный анализ между биохимическими показателями сыворотки крови и физиологическими критериями оценки гемодинамики в экспериментальных группах. По результатам работы сделаны следующие выводы:

1) частота формирования ФПН составила 12%, ЖДА – 11%. Чаще всего эти патологии развиваются в возрасте 26-35 лет, реже – в 36-40 лет;

2) для патологической беременности характерны следующие изменения биохимических показателей крови во всех возрастных группах: незначительная гипопроотеинемия, некоторое повышение уровня глюкозы, снижение концентрации мочевины в полтора раза, незначительная гиперхолестеринемия, повышение активности ЩФ более чем в два раза, снижение уровня Нв.

3) при патологической беременности, сопровождающейся НГ, отмечены незначительная гипопроотеинемия, некоторая гипогликемия, снижение уровня мочевины более чем в полтора раза, незначительная гиперхолестеринемия, повышение активности ЩФ более чем в полтора раза.

Таблица 6. Взаимосвязь биохимических и функциональных показателей крови женщин с патологиями третьего триместра беременности, осложнёнными нарушениями гемодинамики

	СДО СМА			СДО ПА			СДО ЛМА			СДО ПМА		
Общий белок		*	+									
Общий билирубин												
		*	+									
АЛТ												
АСТ												
Глюкоза												
Мочевина												
Креатинин												
Холестерин												
ЩФ												
Hb												
Обозначения		1А (ФПН) 0,3< r <0,7	1Б (ФПН) 0,3< r <0,7	2 (ФПН) 0,3< r <0,7	ФПН, не осложнённая	0,7< r	(r – корреляция)					
		1А (ЖДА) 0,3< r <0,7	1Б (ЖДА) 0,3< r <0,7	2 (ЖДА) 0,3< r <0,7	ЖДА, не осложнённая	$\pm$	характер связи	- значи мость связи				

Таким образом, при сравнении двух методов оценки развития патологического процесса беременных в третьем триместре были обнаружены корреляционные связи: между показателями СДО СМА и общего белка в группе НГ 1Б; между показателями СДО ПМА и общего белка в группе нарушений гемодинамических процессов второй степени; между показателями СДО ЛМА и мочевины в группе НГ второй степени; между показателями СДО ПМА и глюкозы, в группе НГ 1Б степени. Что означает, что биохимические и физические методы исследования не только дополняют представления о патологическом процессе в организме беременной женщины, но и могут самостоятельно свидетельствовать о развитии нарушений в третьем триместре беременности.

Список литературы / References:

1. Балданова М.Т. Фетоплацентарная недостаточность. *Вестник Бурятского Государственного Университета*, 2010, № 12, с. 267-271. [Baldanova M.T. Fetoplacental insufficiency. *Vestnik Buratskogo Gosuniversiteta*, 2010, no. 12, pp. 267-271. (In Russ.)]
2. Выхристюк Ю.В., Ильенко Л.И., Шалина Р.И., Сичинава Л.Г., Караганова Е.Я., Плеханова Е.Р., Лебедев Е.В., Спиридонов Д.С. Железодефицитная анемия у беременных: принципы лечения и профилактики. *Лечебное дело*, 2017, № 1. с. 24-34. [Vihristyuk Yu.V., Ilenko L.I., Shalina R.I., Sichinava L.G., Karaganova E.Ya., Plehanova E.R., Lebedev E.V., Spiridonov D.S. Iron deficiency anemia in pregnant women: principles of treatment and prevention. *Lechebnoye delo*, 2017, no. 1, pp. 24-34. (In Russ.)]
3. Кишкун А.А. *Руководство по лабораторным методам диагностики*. М., 2014, 760 с. [Kishkun A.A. *Laboratory diagnostic manual*. M., 2014, 760 p. (In Russ.)]
4. Коваленко М.С. Особенности гестационного процесса у первородящих женщин в подростковом и старшем репродуктивном возрасте. *АГ-Инфо*, 2011, № 3, с. 20-25. [Kovalenko M.S. Features of the gestational process in primiparous women in adolescence and older reproductive age. *AG-Info*, 2011, no. 3, pp. 20-25. (In Russ.)]
5. Колесникова Н.В. *Лабораторные нормы беременных*. Краснодар, 2016, 34 с. [Kolesnikova N.V. *Laboratory norms of pregnant women*. Krasnodar, 2016, 34 p. (In Russ.)]
6. Меньшиков В.В. *Руководство по клинической лабораторной диагностике*. М., 1982, 576 с. [Menshikov V.V. *Clinical laboratory diagnostic guide*. M., 1982, 576 p. (In Russ.)]
7. Коханов А.В., Ямпольская И.С., Бисалиева Р.А., Мамиев О.Б., Мяснянкин А.А. Пять параметров фермента щелочной фосфатазы в сыворотках крови беременных женщин и их значение для диагностики плацентарной недостаточности. *Фундаментальные исследования*, 2014, № 10, с. 1509-1514. [Kohanov A.V., Yampolskaya I.S., Bisaliev R.A., Mamiev O.B., Myasnyankin A.A. Five parameters of the enzyme of alkaline phosphatase in the blood serum of pregnant women and their significance for the diagnosis of placental insufficiency. *Fundamentalnye issledovaniya*, 2014, no. 10, pp. 1509-1514. (In Russ.)]
8. Базарнова М.А., Воробьева А. И. *Руководство по клинической лабораторной диагностике*. М., 1990, 319 с. [Bazarnova M.A., Vorobeva A. I. *Clinical laboratory diagnostic guide*. M., 1990, 319 p. (In Russ.)]
9. Савченко Т.Н., Агаева М.И., Дергачева И.А. Железодефицитная анемия как фактор риска угрозы прерывания беременности. *Российский медицинский журнал*, 2014, № 1, с. 46-49. [Savchenko T.N., Agaeva M.I., Dergacheva I.A. Iron deficiency anemia as a risk factor for the threat of termination of pregnancy. *Rossiyskiy meditsinskiy journal*, 2014, no. 1, pp. 46-49. (In Russ.)]
10. Ядворская С.Д., Николаева М.Г. Течение и исходы беременности у пациенток старшего репродуктивного возраста. *Здоровье и образование*, 2016, № 18, с. 58-60. [Yadvorskaya S.D., Nikolaeva M.G. The course and outcomes of pregnancy in patients of older reproductive age. *Zdoroviye i obrazovaniye*, 2016, no. 18, pp. 58-60. (In Russ.)]

CORRELATION RELATIONSHIP OF FUNCTIONAL DIAGNOSTIC METHODS AND BIOCHEMICAL RESEARCH METHODS IN THE EVALUATION OF THE FORMATION OF THE THIRD PREGNANCY TRIMEST

Zolotavina M. L.

Kuban State University

Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: zolotavina_m@mail.ru

Abstract. Abstract: The article considers the correlation analysis between the indicators of biochemical methods (total protein, bilirubin, ALT, AST, glucose, urea, creatinine, cholesterol, alkaline phosphatase) and the functional diagnostic method: Dopplerometry method (SDA SMA, PA, LMA, PMA), used in the diagnosis and accompanying the development of the pathological process, fetoplacental insufficiency and iron deficiency anemia, complicated by impaired hemodynamics and without it) and of pregnant women in the third trimester.

Key words: physicochemical methods, dopplerometry method, fetoplacental insufficiency, iron deficiency anemia.

ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ТАНДЕМНОМУ МЕТОДУ ВЭЖХ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Истомин Д.С., Золотавина М.Л.

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru, zolotavina_m@mail.ru,

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. В работе рассматривается иммунохемилюминесцентный метод, выступающий как надёжная и более экономически выгодная альтернатива более современному методу, такому как ВЭЖХ-масс-спектрометрия. Иммунохемилюминесцентный метод, основанный на комплиментарном специфичном взаимодействии антигена и антител, меченых хемилюминесцентными метками. Такой способ маркировки молекул обеспечивает высокую точность и чувствительность метода, позволяющее обнаруживать очень низкие количества вещества, в которых они присутствуют в живых организмах. Предел обнаружения концентрации соединений является 2 мкг/мл. Это становится возможно благодаря ферментативно усиленной хемилюминесценции, происходящей при образовании 3-аминофталата в результате реакции люминола с супероксидным радикалом и последующим усилением хемилюминесценции благодаря активаторам. Данный метод не отстаёт по аналитическим характеристикам от методов более современных, однако он не имеет многих отрицательных черт, присущих современным методам. Иммунохемилюминесцентный метод является относительно недорогим, а вариabельность анализаторов, использующих этот метод, позволяет применять его как в больших, так и малых медицинских лабораториях. Использование иммунохемилюминесцентного метода в анализаторе «ARCHITECT i2000» для определения вальпроевой кислоты у детей разного возраста показало конкурентоспособность данного метода. Результаты, полученные на анализаторе, отличались высокой точностью, чувствительностью и специфичностью. Показатели вальпроевой кислоты коррелировали с возрастными группами детей, у которых были взяты образцы крови.

Ключевые слова: ВЭЖХ-масс-спектрометрия, вальпроевая кислота, иммунохемилюминесцентный метод.

ВВЕДЕНИЕ

Для определения концентрации разных химических соединений в жидкостях организма в современной биохимической физике используют большое количество методов. Такое разнообразие методов и их вариаций обусловлено разными критериями использования метода, такими как точность определения, показывающая качество измерения и отражающее близость результатов к истинному значению, или специфичность метода, показывающая способность метода выявлять определённое вещество из раствора. Сходимость и воспроизводимость метода позволяют оценить надёжность метода в разных и одинаковых условиях его применения.

Особенно важно использовать наиболее точные методы для идентификации соединений в терапевтическом мониторинге лекарственных средств. Это необходимо для правильного распознавания концентрации соединения и последующей корректировке дозы препарата. Такой подход используется для многих препаратов, имеющих накопительную способность, в том числе и вальпроевая кислота.

Одним из наиболее современных методов для обнаружения вальпроевой кислоты считается метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используемый в тандеме с методом масс-спектрометрии (МС). Такое сочетание методов позволяет регистрировать вещества с очень низкой концентрацией и высокой точностью.

В этом методе вальпроевую кислоту и её метаболиты идентифицируют масс-спектрометрически. Детекция количества вальпроевой кислоты происходит в режиме регистрации множественных ионов при отрицательной поляризации. Определение вальпроевой кислоты происходит по значению MRM-переходов. Для этого получают масс-спектры путём прямого ввода образцов в масс-детектор с использованием шприцевого насоса. Растворителем выступает метанол с 0,1 % ацетата аммония. Однако такое определение считали несообразным для вальпроевой кислоты и поэтому для определения вальпроатов в будущем использовали метод ВЭЖХ. Условия такой хроматографии являются универсальными для определения вальпроевой кислоты и её метаболитов, а время проведения метода не превышало 2 минут.

Данная методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии позволяет определить вальпроевую кислоту и её метаболиты в одной пробе. Она отличается малым количеством времени исследования, отсутствием отдельной пробоподготовки каждого анализа, необходимостью небольшого объёма биоматериала – около 200 мкл плазмы крови на один анализ. Аналитический диапазон определения для вальпроевой кислоты составляет 1-200 мкг/мл, а для её метаболитов – 10-500 нг/мл. Однако, такая методика имеет несколько

недостатков для современных лабораторных исследований. Данные методы не автоматизированы и требуют затраты времени на их постановку. Поскольку это требует большого количества времени, это не подойдёт для больших лабораторий с большим потоком исследований. Для маленьких лабораторий такая методика также будет не эффективна, поскольку стоимость реактивов и оборудования для постановки этой методики будут экономически не выгодны. Учитывая недостатки такой методики, можно сделать вывод, что этот метод на данный момент не является достаточно оптимизированным и состоятельным для крупных или малых медицинских лабораторных исследований. Недостатки этой методики удалось решить с использованием иммунохемилюминесцентного метода.

Принцип иммунохемилюминесцентного метода основан на комплиментарном соединении субстрата и антитела, вступающих в реакцию. Эта реакция сопровождается хемилюминесценцией, происходящей в присутствии пероксида водорода и катализатора. Для обеспечения высокой хемилюминесцентной активности при выполнении затратных по времени методов исследований и для выполнения аналитических целей используют активаторы (усилители) хемилюминесценции [2].

Активаторами хемилюминесценции выступают соединения, образующие молекулы в возбуждённом электронном состоянии при реакции с активными формами кислорода или свободными радикалами. Переход образованных в этих реакциях продуктов из возбуждённого состояния в основное приводит к высвечиванию электронов и, как следствие, наблюдаемому свечению.

Иммунохемилюминесцентный анализ весьма конкурентоспособен и обладает большой чувствительностью, занимает меньше времени на исследование и практически сравним по специфичности и чувствительности с методом ВЭЖХ-масс-спектропии, за счет применения активаторов хемилюминесцентных меток, ускоряющих иммунологическую реакцию. Также он может быть полностью автоматизирован. Данный метод относительно малозатратный и способен применяться как в больших, так и в малых медицинских лабораториях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данные для исследовательской работы были получены на базе ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» г. Краснодара в период с июня по октябрь 2019 года.

Материалом для исследования явилась венозная кровь детей с эпилептическим статусом. Для определения биохимических показателей использовали сыворотку венозной крови пациентов. Забор крови производился из локтевой вены посредством пункции. Объем крови, необходимой для выполнения методики, составлял 4-5 мл для одного исследования. Кровь смешивали в пробирке с противосвёртывающим веществом (гепарин, натрия цитрат). Объём забираемой из вены крови определяли из расчёта 1-2 мл на каждый вид анализа [1].

В работе исследовались сыворотки 152 пациентов в возрасте от 4 месяцев до 18 лет (табл. 1).

Среднее значение показателей и стандартную ошибку определяли с помощью Microsoft Excel 2016.

Измерение концентрации вальпроевой кислоты в сыворотке крови проводилось на автоматическом анализаторе «ARCHITECT i2000» с использованием иммунохемилюминесцентного метода. Для постановки метода использовались реагенты «IP35 ARCHITECT iValproic Acid Reagent Kit».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было исследовано образцы плазмы крови 152 детей разного возраста при помощи иммунохемилюминесцентного метода (ИХЛА) на автоматическом анализаторе «ARCHITECT i2000» с использованием реагентов «IP35 ARCHITECT iValproic Acid Reagent Kit». Рекомендуемым терапевтическим диапазоном у детей принята концентрация вальпроевой кислоты в сыворотке крови 50-100 мкг/мл.

Полученные нами данные по определению концентрации вальпроевой кислоты, представлены на таблице 2.

Из данных таблицы 2 видна зависимость повышения концентрации вальпроевой кислоты от повышения возраста ребёнка. Такие показатели могут свидетельствовать о высокой дозе получаемого препарата и необходимости его корректировки. Этот эффект может быть связан с повышением дозы во время роста ребёнка. Нельзя исключать возможности того, что повышенная концентрация вальпроевой кислоты связана с недостаточно верным расчётом дозы препарата, назначаемой лечащим врачом, или с индивидуальной реакцией организма на препарат, примером которой может быть накопление сверхвысокой концентрации препарата в крови у так называемых «медленных метаболитов».

Таблица 1. Контингент пациентов

Группы детей, возраст	1 группа (до 2-х лет)	2 группа (от 3-х до 7 лет)	3 группа (от 8 до 18 лет)
Количество человек в группах (n)	32	64	56

Таблица 2. Концентрация вальпроатов в сыворотке крови пациентов разных групп

Группа детей	1 группа	2 группа	3 группа
Концентрация вальпроатов, мкг/мл	66,05±1,34	93,33±0,45	102,61±0,51
Референтные значения в сыворотке крови: 50-100 мкг/мл			

В иммунохемилюминесцентном методе кроме субстрата и антитела, вступающих в реакцию, присутствуют другие соединения, которые позволяют оценивать концентрацию вальпроевой кислоты и которые приводят к хемолуминесценции. Также для этой цели в методе присутствуют активаторы (усилители) хемолуминесценции.

Активаторами хемилуминесценции выступают соединения, образующие молекулы в возбуждённом электронном состоянии при реакции с активными формами кислорода или свободными радикалами. Переход образованных в этих реакциях продуктов из возбуждённого состояния в основное приводит к высвечиванию электронов и, как следствие, наблюдаемому свечению. Наиболее часто используемые активаторы – люминол (3-аминофталевый гидразид) и люцигенин. В качестве окислителя используют радикал гидроксила. Под его воздействием образуется радикал люминола. Люминол реагирует с так называемым супероксидным радикалом и вместе они образуют внутреннюю перекись. После она разлагается с образованием возбуждённой молекулы 3-аминофталата. Молекула 3-аминофталата переходит в основное состояние, что вызывает процесс люминесценции. Активатор принимает и конденсирует всю энергию, полученную от молекул. Интенсивность свечения, необходимая для регистратора, определяется квантовым выходом люминесценции активатора, который должен стремиться к единице. От активатора свечение повышается на три-четыре порядка. Таким образом получается хемилуминесценция, усиленная ферментами.

В качестве меток хемилуминесценции в основном используют низкомолекулярные соединения, близкие к люминолу или люциногену. Часто используют изолюминол, сукцинированный люминол, эфиры акридия. Метки присоединяют к антителу, комплементарному искомому антигену. Таким образом, используют иммунологическую реакцию, где в качестве субстрата присоединяют люминофоры. Для регистрации свечения используется люминометр – датчик, фиксирующий уровень свечения. Этот метод используется для определения веществ, как правило, в очень низких концентрациях, в которых они встречаются в организме человека [2].

При использовании иммунохемилюминесцентного анализа берут избыток хемилуминесцентно-меченого антитела, в который добавляют раствор с изучаемым веществом. В результате образуется хемилуминесцентно-меченый иммунный комплекс. Интенсивность хемилуминесценции будет прямо пропорциональна концентрации анализируемого вещества в пробе.

Таким образом, иммунохемилюминесцентный метод является одним из лучших и конкурентоспособных методов определения концентрации вальпроевой кислоты. Он определяет вальпроаты в пробе с высокой чувствительностью и точностью. Анализаторы, работающие с применением этого метода, способны работать в автоматическом режиме и делать до 200 тестов в час. Такие характеристики существенно превосходят аналогичные методы определения вальпроевой кислоты. Аналитический диапазон определения вальпроевой кислоты составляет 2-150 мкг/мл, однако образцы с концентрацией более 150 мкг/мл анализаторы способны автоматически разбавлять и получать точные данные. Иммунохемилюминесцентный метод позволяет обеспечить индивидуальный подход к лечению пациентов с эпилепсией разного генеза.

Список литературы / References:

1. Большая Медицинская Энциклопедия. 3-е издание, онлайн версия. Российская академия медицинских наук, 2014. [Big Medical Encyclopedia. 3rd edition, online version. Russian Academy of Medical Sciences, 2014. (In Russ.)].
2. Иммунохемилюминесцентный метод. Современные методы лабораторной диагностики: справочное пособие для врачей. АстроМЕД. 2012. [Immunochemiluminescent method. Modern methods of laboratory diagnostics: a reference guide for doctors. AstroMED, 2012. (In Russ.)]. URL: <http://astromed.biz/informacionnie-materiali/spravochnie-posobija/>.

IMMUNOCHEMILUMINESCENT ANALYSIS AS AN ALTERNATIVE TO THE TANDEMIC HPLC-MASS-SPECTROMETRY METHOD FOR THE DETERMINATION OF VALPROIC ACID

Istomin D.S., Zolotavina M.L.

Kuban State University

Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: istomin.dmitriy.94@mail.ru, zolotavina_m@mail.ru

Abstract. The work considers the immunochemiluminescent method, which acts as a reliable and more cost-effective alternative to a more modern method, such as HPLC-mass-spectrometry. Immunochemiluminescent method based on the complementary specific interaction of antigen and antibodies labeled with chemoluminescent labels. Such a labeling technique provides high accuracy and sensitivity of the method, allowing to detect very low amounts of the substance in which they are present in living organisms. The detection limit for the concentration of compounds is 2 mkg/ml. This becomes possible due to enzymatically enhanced chemiluminescence which occurs during the formation of 3-aminophthalate as a result of the reaction of luminol with a superoxide radical and the subsequent enhancement of chemiluminescence due to activators. This method does not lag behind analytical methods from more modern methods, but it does not have many of the negative features inherent in modern methods. The immunochemiluminescent method is relatively inexpensive, and the variability of analyzers that use this method allows it to be used in both large and small medical laboratories. The use of the immunochemiluminescent method in the ARCHITECT i2000 analyzer for determining valproic acid of children of different age showed the competitiveness of this method. The results obtained on the analyzer were characterized by high accuracy, sensitivity and specificity. Valproic acid values correlated with the age of children whose blood samples were taken.

Key words: HPLC-mass-spectrometry, valproic acid, immunochemiluminescent method.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИФА В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ НОРО- И РОТАВИРУСАМИ

Крипакова В.В., Золотавина М.Л.

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: lera_k13@mail.ru

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. В статье представлен анализ литературы об имеющихся на современном этапе методах диагностики острой кишечной инфекции (ОКИ) вирусной этиологии. В данной работе был рассмотрен метод ИФА, выявлены преимущества и недостатки в сравнении с другими известными методами лабораторной диагностики. Эффективность метода была подтверждена исследованием изменений концентрации антигена вирусов в образцах фекалий у больных рота- и норовирусной инфекцией в возрасте от 18 до 85 лет. Проведение ИФА с использованием набора реагентов Вектор-Бест позволило установить концентрацию антигенов вирусов в копроматериале больных, а также определить тяжесть течения заболевания у лиц разного возраста и пола. Было выяснено, что остро и тяжело протекала ротавирусная инфекция у женщин в возрасте 36-55 лет, со средней степенью тяжести – у мужчин в возрасте 36-60 лет. При норовирусной инфекции происходят кратковременные воспалительные изменения в слизистой оболочке тонкой кишки, сопровождающиеся умеренной интоксикацией.

Ключевые слова: острая кишечная инфекция, иммуноферментный анализ, норовирус, ротавирус.

ВВЕДЕНИЕ

Острые кишечные инфекции (ОКИ) – группа острых инфекционных заболеваний человека, вызываемых различными инфекционными агентами с алиментарным механизмом заражения, характеризующиеся поражением желудочно-кишечного тракта, диареей, дегидратацией [1]. При острых кишечных инфекциях происходят нарушения полостного, пристеночного и внутриклеточного пищеварения, всасывания питательных веществ, а также моторной функции тонкой кишки. Это связано с тем, что вирусы, проникая в клетки ворсинок слизистой оболочки, начинают реплицироваться и приводят к гибели клеток. Происходит уменьшение числа энтероцитов, а по причине ускоренного митоза появляются структурно и функционально незрелые клетки, которые не успевают дифференцироваться. В просвете кишечника накапливаются нерасщеплённые дисахариды вследствие недостаточности ферментов, нарушается абсорбция моносахаридов, что приводит к повышению осмотического давления в полости толстой кишки, нарушению баланса между секрецией и всасыванием воды и электролитов и усиленной моторике кишечника. Это в свою очередь, ведёт к нарушению кислотно-основного состояния и развитию метаболического ацидоза [2]. Тяжесть болезни и продолжительность инкубационного периода ОКИ зависят от количества проникших в организм возбудителей, их патогенности, серотипа, а также состояния макроорганизма [3].

В государственном докладе «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018» Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека было зарегистрировано в 2018 году более 816 тыс. случаев ОКИ (555,71 на 100 тыс. населения), при этом отмечался рост заболеваемости норовирусной инфекцией в 1,6 раза по сравнению с 2017 годом и составил 33,56 на 100 тыс. населения. Заболеваемость ротавирусной инфекцией в 2018 году находилась на уровне предшествующих лет (81,3 на 100 тыс. населения) [7].

Рота- и норовирусы имеют сложное строение и обладают всеми необходимыми приспособлениями, которые делают их успешными патогенами проксимального отдела тонкой кишки. Вирусы нарушают процесс переваривания и всасывания веществ в тонком отделе кишечника. Накопление избыточного количества негидролизированных углеводов в просвете кишки приводит к потере жидкости через желудочно-кишечный тракт. А некомпенсированная дегидратация может привести к патологическим изменениям всех видов обмена веществ, накоплению токсических метаболитов и их вторичным воздействиям на органы и ткани больных.

Диагностика ОКИ вирусной этиологии заключается в том, чтобы своевременно обнаружить и идентифицировать возбудителя заболевания, что позволит правильно поставить диагноз, подобрать необходимые лечебные мероприятия, назначить водо- и электролитозамещающую терапию, а также исключить необоснованное применение антибиотиков и антибактериальных препаратов.

Для проведения диагностики ОКИ вирусной этиологии необходимо выбрать правильный, надежный и быстрый метод исследования, который имеет высокую специфичность, воспроизводимость и чувствительность.

Согласно литературным источникам, в настоящее время в диагностике ОКИ, вызванной рота- и норовирусами, применяются методы, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1. Методы лабораторной диагностики рота- и норовирусной инфекции

Методы		Ротавирус	Норовирус
Морфологические (электронная микроскопия)		-	+
Молекулярно-биологические (ОТ-ПЦР)		+	+
Иммунологические (серологические)	Латекс-агглютинация	+	-
	Реакция пассивной гемагглютинации	+	-
	Радиоиммунный анализ	+	-
	ИФА	+	+
	Иммунофльтрация	-	+
	Иммунофлюоресценция	+	-
	Иммунохроматографические экспресс-тесты	+	+

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ СКИБ в г. Краснодаре в период с сентября 2018 года по апрель 2019 года. Были проанализированы данные обследования 348 человек с учётом возраста и пола, из них: 98 человек с ротавирусной инфекцией (59,2% женщин и 40,8% мужчин), 114 человек с норовирусной инфекцией (52,6% женщин и 47,4% мужчин).

Материалом исследования служили образцы фекалий у больных острой кишечной инфекцией, вызванной норо- и ротавирусами.

Методы исследования: иммуноферментный анализ, теоретические и метатеоретические (классификация, обобщение, системный синтез, аналогия, индукция, дедукция). Математическая обработка результатов методами вариационной статистики была произведена в программном приложении Microsoft Excel 2010. Определялись средняя арифметическая величина ($\bar{X}$), стандартное отклонение ($\pm m$), значимость различий (p).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной обзорной статье была проанализирована информация, связанная с использованием метода ИФА при диагностике острых кишечных инфекций, вызванных норо- и ротавирусами. Для подтверждения работы метода были определены изменения концентрации антигена вирусов в образцах фекалий у больных острой кишечной инфекцией, вызванной норо- и ротавирусами с использованием набора реагентов для ИФА Вектор-Бест.

Метод определения антигена ротавируса в фекалиях человека основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Принцип метода заключается во взаимодействии антигена ротавируса с антителами, иммобилизованными в лунках полистиролового планшета. Комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата. Количество связанного конъюгата выявляют цветной реакцией с использованием перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена ротавируса в анализируемых образцах. Затем измеряют величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Метод определения норовирусов основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Во время первой инкубации происходит связывание антител, иммобилизованных на внутренней поверхности лунок с антигенами норовируса. После промывки во время второй инкубации вносят конъюгат стрептавидин-пероксидазы, который связывается с антителами. Комплекс «антиген-биотинилированное антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена норовируса в анализируемых образцах. Затем измеряют величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620-650 нм [5].

Для оценки результатов анализа вычисляют критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит}$) по формуле:

$$ОП_{крит} = ОП_{cp}(K^-) + 0,2, \quad (1)$$

где $ОП_{cp}(K^-)$ – среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным образцом, которое не превышает 0,20.

Таблица 2. Значения оптической плотности образцов и критическое значение оптической плотности образцов фекалий у мужчин и женщин, больных ротавирусной инфекцией

Пол	Возрастные группы	Оптическая плотность образцов	Критическое значение оптической плотности
М	20-35 лет	2,05±1,08	0,218±0,006
	36-60 лет	2,11±0,89	0,249±0,08
	61-80 лет	1,785±1,06	0,225±0,009
Ж	18-35 лет	1,80±0,98	0,222±0,01
	36-55 лет	2,59±0,86	0,2209±0,005
	56-85 лет	2,11±0,95	0,229±0,048

Таблица 3. Значения оптической плотности образцов и критическое значение оптической плотности образцов фекалий у мужчин и женщин, больных норовирусной инфекцией

Пол	Возрастные группы	Оптическая плотность образцов	Критическое значение оптической плотности
М	20-35 лет	1,59±0,99	0,251±0,011
	36-60 лет	1,15±0,65	0,258±0,02
	61-80 лет	1,49±1,04	0,255±0,01
Ж	18-35 лет	1,185±1,06	0,258±0,01
	36-55 лет	1,08±0,82	0,252±0,011
	56-85 лет	1,03±0,57	0,261±0,005

Результат анализа считают положительным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом равно или превышает $ОП_{крит}$ ($ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$). Результат анализа считают отрицательным, если значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом ниже $ОП_{крит}$ ($ОП_{обр} < ОП_{крит}$).

Значения оптической плотности образцов и критического значения оптической плотности образцов фекалий у больных рота- и норовирусной инфекцией в возрасте от 18 до 85 лет представлены в таблице 2 и 3.

Из таблиц 2 и 3 видно, что наиболее остро и тяжело протекала ротавирусная инфекция во второй возрастной группе женщин. Со средней степенью тяжести протекала ротавирусная инфекция во второй возрастной группе мужчин. Для норовирусной инфекции наиболее характерны непродолжительные симптомы гастроэнтерита, сопровождающиеся умеренно или слабо выраженным болевым и интоксикационным синдромом [9].

По сравнению с другими методами, ИФА имеет несколько преимуществ:

1. Норовирусы содержатся в копроматериале в малых концентрациях. Помимо этого, они практически не отличаются морфологически от других вирусов, поэтому выявление вирусов в образцах фекалий с использованием электронной микроскопии является затруднительным. Чувствительность метода невысока – 35-50%. ПЦР-ОТ, в отличие от ИФА и электронной микроскопии, является более чувствительным и специфичным, но при наличии негативных факторов (низкие концентрации вируса, неправильное хранение образцов, неэффективность вирусной экстракции РНК, наличие ингибиторов обратной транскриптазы) этот метод показывает меньшую эффективность в обнаружении вируса в фекалиях. Чувствительность же тест-систем ИФА оценивается как 60–90% при специфичности, близкой к 100%, но на практике чувствительность метода не превышает 70% [6];

2. ИФА вытеснил бактериологические и вирусологические методы из лабораторной диагностики, поскольку для идентификации вируса требовалось достаточно много времени (выделение и выращивание на питательной среде от 48 до 72 часов). Культивирование ротавирусов сопряжено со значительными сложностями, а норовирус относят к некультивируемым вирусам. Поэтому перечисленные методы к ним неприменимы;

3. Большинство тест-систем и реактивов для ИФА, которые используются в клинической лабораторной диагностике, выпускаются в промышленных условиях, что гарантирует точный результат;

4. ПЦР-ОТ и различные модификации этого метода (мультиплексная ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «по конечной точке»; иммуно-ПЦР «по конечной точке» с детекцией в реальном времени; количественная ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени) являются долгими и

трудными в применении. Кроме того, оборудование для выполнения диагностики с помощью вышеперечисленных методов труднодоступно из-за высокой стоимости. Поэтому предпочтение отдается ИФА, т.к. этот метод доступен для практических лабораторий, прост в постановке, позволяет достаточно быстро получить результат, имеет цветовую кодировку растворов, а методики анализа легко поддаются автоматизации и широко используются при скрининговых исследованиях большого количества проб [8];

Недостатки использования ИФА:

1. В качестве альтернативы методу ИФА может быть использован иммунохроматографический экспресс-тест, чувствительность и специфичность которого близка к соответствующим показателям наборов для ИФА. При этом исследования выполняются быстро, проведение анализа и интерпретация результата очень просты, для проведения исследований не требуется специальное оборудование [10];

2. Методика ИФА подразумевает, что врач заранее имеет предположение о природе заболевания;

3. Метод ИФА – крайне точный, но не дешевый метод.

4. Метод ИФА не рекомендуется использовать для установления этиологии sporadических случаев норовирусной инфекции, так как он обладает недостаточной чувствительностью и специфичностью в отношении ряда генотипов норовирусов.

5. Существенными недостатками твердофазного ИФА являются необходимость предварительной калибровки и длительной пробоподготовки [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из анализа полученной информации, можно сделать вывод, что ИФА, относящийся к группе иммунологических методов, имеет прямое отношение к такому направлению как «Медицинская биофизика», поскольку является наиболее доступным, точным и экономичным методом клинической лабораторной диагностики для своевременной идентификации возбудителей острой кишечной инфекции вирусной этиологии.

Однако он не лишен и недостатков в сравнении с другими методами.

Список литературы / References:

1. Баранов А.А. *Детские болезни*: учебник. Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2002, 880 с. [Baranov A.A. *Children's diseases*: textbook. Moscow: GEOTAR-MED, 2002, 880 p. (In Russ.)]

2. Булатов В.П., Камалова А.А. Хроническая диарея у детей. *Практическая медицина*, 2012, № 7, с. 38-40. [Bulatov V.P., Kamalova A.A. Chronic diarrhea in children. *Prakticheskaya medicina*, 2012, no. 7, pp. 38-40. (In Russ.)]

3. Григорьев П.Я., Яковенко А.В. *Клиническая гастроэнтерология*: учебник. Москва: Медицинское информационное агентство, 2004, 768 с. [Grigoriev P.Ya., Yakovenko A.V. *Clinical gastroenterology*: textbook. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2004, 768 p. (In Russ.)]

4. Гутенева И.В. *Разработка методов иммунохроматографической детекции малых молекул с использованием магнитных наномаркеров*: специальность 03.01.02 «Биофизика»: дисс. ... канд. физ.-мат. наук / Гутенева Наталия Викторовна: Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет). Москва, 2019, 119 с. [Guteneva I. V. *Development of methods for immunochromatographic detection of small molecules using magnetic nanomarkers*: specialty 03.01.02 "Biophysics": dissertation ... candidate of physical and mathematical Sciences / Natalia Guteneva: Moskovskij fiziko-tekhnicheskij institut (nacional'nyj issledovatel'skij universitet). Moscow, 2019, 119 p. (In Russ.)]

5. *Инструкция по применению набора реагентов для ИФА Вектор-Бест*. Режим доступа: <http://art-medika.com/catalog/IFA/infection/virusy> (дата обращения 06.07.2020). [Instructions for using a set of reagents for ELISA Vector-best. Access mode: <http://art-medika.com/catalog/IFA/infection/virusy> (date of request: 06.07.2020) (In Russ.)]

6. Хохлова Н.И., Капустин Д.В., Краснова Е.И., Извекова И.Я. Норовирусная инфекция (обзор литературы). *Журнал инфектологии*, 2018, № 10, с. 5-14. [Khokhlova N.I., Kapustin D.V., Krasnova E.I., Izvekova I.Ya. Norovirus infection (systematic review). *ZHurnal infektologii*, 2018, no. 10, pp. 5-14. DOI: 10.22625/2072-6732-2018-10-1-5-14. (In Russ.)]

7. *О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году*: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019, 254 с. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018: State report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel' i blagopoluchiya cheloveka, 2019, 254 p. (In Russ.)]

8. Жираковская Е.В., Игнатьев Г.М., Индикова И.Н., Тикунова Н.В. Оценка новой ИФА тест-системы «Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2009, № 3-4, с. 23-38. [Jirkovsky E.V., Ignatiev G.M., Indikova I.N., Tikunova N.V. Evaluation of the new ELISA test system «Rotavirus-antigen-ELISA-BEST» *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*, 2009, № 3-4, pp. 23-38. (In Russ.)]

9. Сагалова О.И. *Клинико-иммунологическая характеристика кишечных инфекций вирусной этиологии у взрослых*: специальность 14.00.10: автореферат дисс. ... д-а мед. наук / Сагалова Ольга Игоревна: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии МЗ РФ. Москва, 2009, 42 с. [Sagalova O.I. *Clinical and immunological characteristics of intestinal infections of viral etiology in adults*: specialty 14.00.10: abstract of the

dissertation ... of the doctor of medical Sciences / Sagalova Olga Igorevna: Central'nyj nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii MZ RF. Moscow, 2009, 42 p. (In Russ.)]

10. *Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции*: 3.1.1 Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции: методические указания: МУ 3.1.1.2969-11 / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва: Роспотребнадзор: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012, 34 с. [Epidemiological surveillance, laboratory diagnostics and prevention of norovirus infection: 3.1.1 prevention of infectious diseases. Intestinal infections: guidelines: MU 3.1.1.2969-11 / Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare. - Moscow: Rospotrebnadzor: Federal'nyj centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2012, 34 p. (In Russ.)]

USING THE ELISA METHOD IN THE DIAGNOSIS OF ACUTE INTESTINAL INFECTIONS CAUSED BY NORO-AND ROTAVIRUSES

Kripakova V.V., Zolotavina M. L.

Kuban state University

Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: lera_k13@mail.ru

Abstract. The article presents an analysis of the literature on currently available methods for diagnosing acute intestinal infection (Oki) of viral etiology. This work considers the ELISA method, identifies it's advantages and disadvantages compared to other known methods of laboratory diagnostics. The effectiveness of this method was confirmed by the study of changes in the concentration of viral antigen in fecal samples of patients aged 18 to 85 with rot and norovirus infection. Carrying out ELISA with use of a set of reagents vector-best allowed to establish the concentration of viral antigens in the copromaterial of patients, as well as to determine the severity of the disease in individuals of different ages and genders. It was found that rotavirus infection was acute and severe among women of age 36-55 and with an average degree of severity among men of age 36-60. During the norovirus infection, short-term symptoms of gastroenteritis accompanied by moderate or light pain and intoxication syndrome, are most characteristic.

Key words: *acute intestinal infection, enzyme-linked immunosorbent assay, norovirus, rotavirus.*

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРЕМНИЕВЫХ СОРБЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ НЕФЕЛИНОВОГО КОНЦЕНТРАТА

Веляев Ю.О.¹, Майоров Д.В.²

¹ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

² Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И.В. Тананаева – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ «Кольский научный центр РАН» (ИХТРЭМС КНЦ РАН),

Академгородок, 26а, г. Апатиты, 184209, РФ

Поступила в редакцию: 10.07.2020

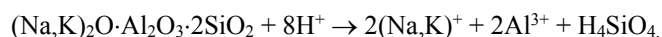
Аннотация. В работе показана возможность получения на основе кислотного разложения нефелинового концентрата высокоэффективных кремниевых сорбентов с заданными структурно-поверхностными свойствами – удельными поверхностью и объемом, диаметром частиц и др. Приведены физико-химические свойства образцов диоксида кремния, полученных разложением нефелинового концентрата азотной и серной кислотами, причём при вскрытии нефелина раствором серной кислоты предложено использовать системы $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}$ и $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Приведены данные по сорбции-десорбции и распределению объема пор по их диаметру полученных образцов SiO_2 , на основании которых сделаны выводы о типе и форме пор, преобладающих в образцах. Показано, что из нефелина могут быть получены как мезо-, так и микро- и макропористые кремнезёмы с развитой удельной поверхностью ($285\div 600 \text{ м}^2/\text{г}$). Сделан вывод о том, что на основе нефелинового концентрата могут быть получены кремниевые сорбенты с контролируемыми структурно-поверхностными свойствами.

Ключевые слова: аморфный диоксид кремния, нефелин, сорбция, удельная поверхность, пористая структура.

На сегодняшний день кремниевые сорбенты, представляющие собой аморфный диоксид кремния, находят широкое применение в фармацевтической промышленности. Они могут применяться как в чистом виде в качестве энтеросорбентов, так и входить в состав лекарственных препаратов, а также использоваться во вспомогательных целях при терапиях различных заболеваний [1-9]. Высокая сорбционная эффективность данного вещества обусловлена в основном его развитой удельной поверхностью. Одновременно важную роль в сорбционных процессах играют и другие характеристики, такие как форма и размер пор [10,11]. Кроме того, важным критерием для использования аморфного диоксида кремния в медицинских целях является его химическая чистота. Именно этим фактором обуславливается использование в современной фармацевтической промышленности кремнезёмов, полученных из реактивного сырья, в основном из кремнийорганических соединений [12-14]. Это обуславливает высокую себестоимость получаемого таким путём аморфного диоксида кремния.

В то же время, существуют способы получения высокочистых аморфных кремнезёмов из природного минерального сырья. Причём такие кремнезёмы по химической чистоте могут быть сопоставимы с применяемым на сегодняшний день в фармацевтической промышленности диоксидом кремния. Сырьём, которое может быть источником для получения таких кремнезёмов, является нефелиновый концентрат, который в больших количествах попутно производится при обогащении апатито-нефелиновых руд Кольского полуострова [15,16]. В настоящее время полномасштабной реализации его нет и большая его часть является отходом производства апатитового концентрата, которая направляется в отвал, что негативно сказывается на экологической обстановке в районе производства из-за активного пылевыветривания в сухое время года. Ввиду этого реализация технологий его переработки позволит не только получить ценные товарные продукты и, тем самым, повысить экономические показатели переработки апатитово-нефелиновых руд в целом, но и существенно снизить экологическую проблему региона по ликвидации данных отвалов.

Нефелиновый концентрат, как минеральное сырьё для получения аморфного диоксида кремния обладает рядом уникальных характеристик, которые подчёркивают уникальность данного источника кремнезёма [17,18]. Он обладает относительно постоянным составом и разлагается практически всеми минеральными и даже некоторыми органическими кислотами при комнатных условиях без дополнительного повышения давления и жёстких температурных условий. При его разложении в раствор переходят соли алюминия, натрия, калия и железа, которые отделяются в виде квасцов, а растворённый кремнезём остаётся в растворе, что проиллюстрировано реакцией:



Конечно, решающими являются значения удельной поверхности и пористая структура получаемых кремнезёмов. Ведь именно эти факторы являются основополагающими для наличия сорбционных свойств, необходимых для их фармацевтической функциональной необходимости. Причём необходимо отметить, что

технологические особенности получения кремнезёма, такие как используемая для разложения минеральная кислота, её концентрация, способ смешения реагентов, продолжительность кислотной обработки, выбор разбавителя кислоты, влияют на конечные структурно-поверхностные свойства SiO_2 , что говорит о возможности синтеза высокочистых аморфных кремнезёмов с заданными структурно-поверхностными свойствами из нефелинового концентрата.

Для подтверждения высказанного предположения нами было получено три образца кремнезёма из стандартного нефелинового концентрата производства ОАО «Апатит» (г. Кировск), содержащий, мас. %: SiO_2 – 43,3%; Al_2O_3 – 28,48%; Na_2O – 14,25%; K_2O – 7,24%; Fe_2O_3 – 3,74%; примеси (CaO и др.) – остальное.

Образец SNH был получен с использованием в качестве разбавителя HNO_3 дистиллированной воды. Разложение нефелинового концентрата (НК) осуществляли в стеклянном реакторе в течение 15 минут при температуре смешения получаемого раствора азотной кислоты с водой и интенсивном перемешивании. По завершении процесса нерастворимая минеральная часть реакционной пульпы отделялась от жидкой фазы фильтрацией на лабораторном нутч-филтре. Из полученного кремнеземсодержащего раствора методом кислотной дегидратации выделялся осадок SiO_2 [17], который так же отделялся от раствора фильтрацией, промывался на фильтре и сушился при температуре 105°C до постоянной массы.

Образец SSH синтезирован аналогичным способом, но в качестве минеральной кислоты для разложения НК использовалась серная кислота концентрации 25%. Обработку нефелина кислотой осуществляли в течение 5 минут, полученную пульпу доразбавляли дистиллированной водой до расчетной концентрации H_2SO_4 15% и продолжали перемешивание в течении ещё 10 минут. По завершении процесса разложения нерастворимая минеральная часть реакционной пульпы также отделялась от жидкой фазы фильтрацией, а из полученного кремнеземсодержащего раствора таким же способом, как и при получении образца SNH выделялся осадок SiO_2 . В качестве дегидрирующего агента выступала H_2SO_4 с концентрацией 85%. Выделенный SiO_2 отделялся от раствора и промывался на фильтре до отсутствия в промывных водах SO_4^{2-} -иона (по Ba^{2+}), после чего сушился при температуре 105°C до постоянной массы.

Образец SSE был получен при использовании в качестве разбавителя концентрированной H_2SO_4 этилового спирта. Рабочая концентрация H_2SO_4 составляла 15%. Разложение нефелинового концентрата осуществлялось в течение 15 минут при температуре смешения получаемого раствора. Кремнеземсодержащий раствор, отделенный от нерастворимого остатка, выдерживали в течение 48 часов. Содержащиеся в нём соли натрия, калия и алюминия кристаллизовались в виде квасцов $(\text{Na,K})_2\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$, которые отделяли фильтрацией. Маточный раствор подвергали желатинизации при комнатной температуре с образованием геля SiO_2 , который отмывали от сульфат-иона. Промытый гель SiO_2 сушили при температуре 105°C с получением порошка аморфного кремнезёма.

Структурно-поверхностные характеристики образцов, представленные в таблице, определялись на анализаторе удельной поверхности и пористости TriStar 3020 методами BET и ВЈН. В качестве газа-адсорбата использовался азот. Средний диаметр частиц (d) рассчитывали по уравнению: $d = 6/(S_{\text{уд.внеш.}} \cdot \rho)$, где $S_{\text{уд.внеш.}}$ – удельная внешняя поверхность образца, $\text{м}^2/\text{кг}$; ρ – физическая плотность SiO_2 ($2200 \text{ кг}/\text{м}^3$).

Из приведённых в таблице данных видно, что полученные на основе нефелина кремнезёмы обладают развитой удельной поверхностью, которая даже для приведённых образцов варьируется в интервалах от 285 до $600 \text{ м}^2/\text{г}$. Также может изменяться и удельная поверхность микропор, ровно, как и их удельный объём, ширина и диаметр. Средний размер частиц при этом обратно пропорционален их удельной поверхности.

На рисунке 1 приведены изотерма сорбции-десорбции азота полученных образцов SiO_2 . На рисунке 2 – распределение объема пор образцов по их диаметру.

Таблица 1. Структурно-поверхностные свойства образцов диоксида кремния

Показатель \ Образец	SNH	SSH	SSE
1. Удельная поверхность по методу БЭТ, $\text{м}^2/\text{г}$	285,50	393,52	601,70
2. Удельная поверхность микропор, $\text{м}^2/\text{г}$	106,18	7,53	202,93
3. Удельный объём пор ($1.7 \text{ нм} \leq d \leq 300 \text{ нм}$), определенный по методу ВЈН (адсорбция), $\text{см}^3/\text{г}$	0,40	0,76	0,38
4. Ширина пор по методу БЭТ, нм	4,39	7,62	2,52
5. Диаметр пор по методу ВЈН (десорбция), нм	8,28	7,47	2,88
6. Средний диаметр частиц, нм	9,67	6,76	4,57

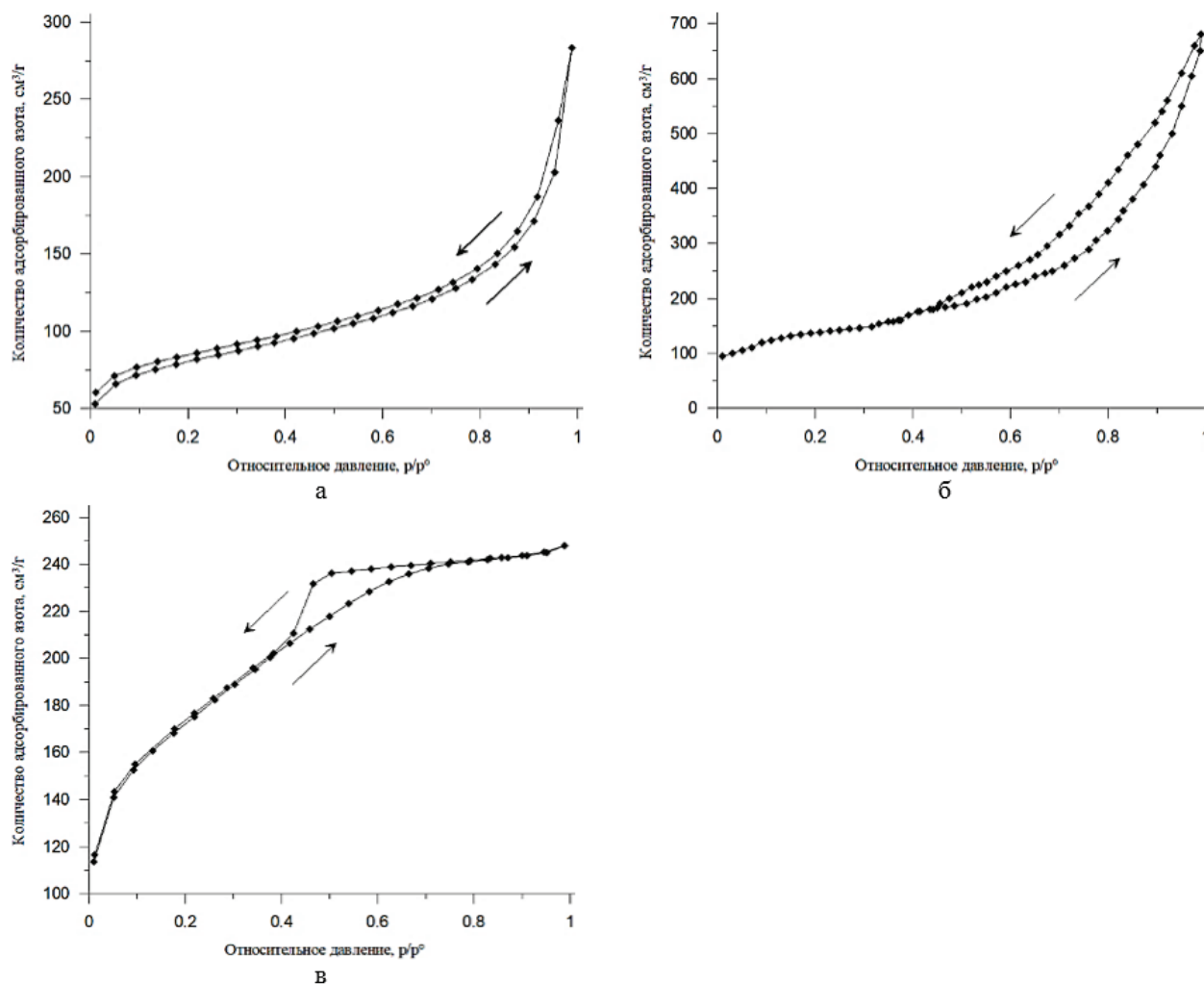


Рисунок 1 – Изотермы сорбции-десорбции азота образцами: 1 – SNH; 2 – SSH; 3 – SSE. (→ – сорбция; ← – десорбция)

Изотерму сорбции-десорбции азота образца SNH можно отнести ко II типу по классификации Брунауэра, Деминга, Деминга и Теллера (БДДТ) [19], что говорит о преобладании макропористой структуры в полученном образце SiO₂. Об этом же говорят и данные рисунка 2а на котором видно преобладание макропористой структуры для образца. Форма петли гистерезиса говорит наличии клиновидных пор в соответствии с типом D по классификации Де Бура. Что касается образца SSH, его изотерму сорбции-десорбции азота можно отнести к II и IV типу по классификации БДДТ, что говорит о смешанной макро-мезопористой структуре полученного аморфного диоксида кремния. Исходя из данных рисунка 2б можно сделать вывод о преобладании мезопористой структуры в данном образце, а также наличии выраженной макропористой структуры. Судя по форме петли гистерезиса можно сделать вывод о её соответствии типу D по классификации Де Бура, что говорит о наличии клиновидных пор, имеющих сужение на одном или обоих концах. Изотерму сорбции-десорбции азота образца SSE, можно отнести к I и IV типу по классификации БДДТ. Это свидетельствует о смешанной микро-мезопористой структуре полученного образца SiO₂. Однако, исходя из данных рисунка 2в и таблицы, следует отметить преобладание в образце мезопор, в то время как объем микропор составляет ~1/3 от общего объема пор. Анализ формы петли гистерезиса позволяет сделать вывод о её соответствии типу А по классификации Де Бура, что он соотносит с наличием пор цилиндрической формы.

Таким образом, в представленном исследовании показана возможность получения из нефелинового концентрата диоксидов кремния с различными структурно-поверхностными характеристиками, которые можно варьировать, изменяя параметры процесса разложения нефелина и выделения высокочистого аморфного кремнезёма, пригодного для использования в качестве сорбентов в фармацевтике, водоочистке, промышленных производствах и машиностроении.

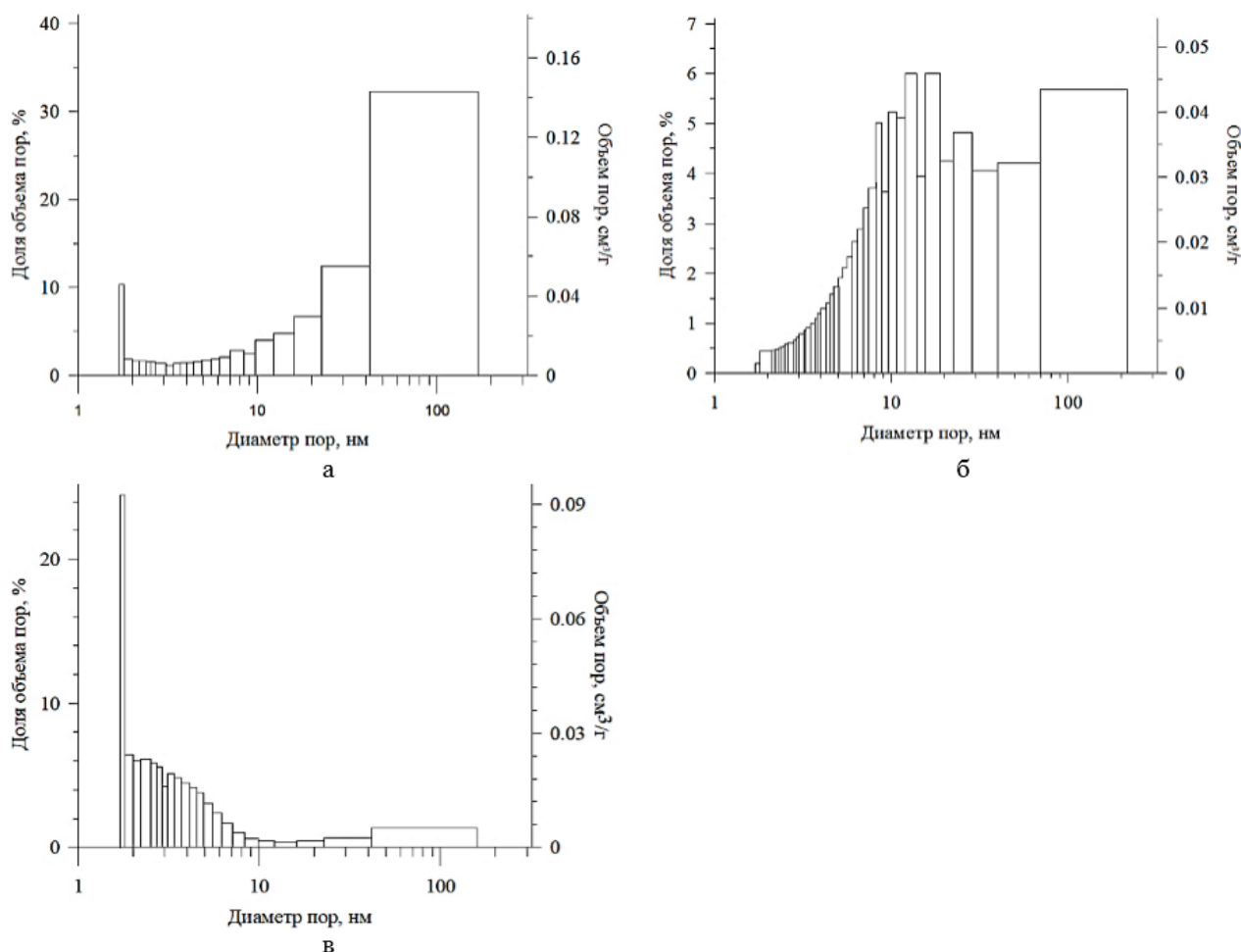


Рисунок 2 – Распределение объема пор по их диаметру для образца: 1 – SNH; 2 – SSH; 3 – SSE

Список литературы / References:

1. Phuong H.T., Huong T.T., Vinh L.T., Khuyen H.T., Thao D.T., Huong N.T., Lien P.T., Minh L.Q. Synthesis and characterization of $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+} @ \text{silica-N=folic acid}$ nanocomplex for bioimaginable detecting MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Rare Earths*, 2019, vol. 37, pp. 1183-1187. DOI: 10.1016/j.jre.2019.01.005.
2. Nethi S.K., Das S., Patra C.R., Mukherjee S. Recent advances in inorganic nanomaterials for wound-healing applications. *Biomaterials Science*, 2019, vol. 7, no. 7, pp. 2652-2674. DOI: 10.1039/c9bm00423h.
3. Asgari V., Landarani-Isfahani A., Salehi H., Amirpour N., Hashemibeni B., Rezaei S., Bahramian H. The Story of Nanoparticles in Differentiation of Stem Cells. *Neural Cells Neurochemical Research*, 2019, vol. 44, no. 12, pp. 2695-2707. DOI: 10.1007/s11064-019-02900-7.
4. Sanganalmatha P.U., Nagarajuc P.M., Sreeramulua K. Determination of quinalphos in human whole blood samples by high-performance thin-layer chromatography for forensic applications. *Journal of Chromatography A*, 2019, vol. 1594, pp. 181-189. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.02.003.
5. Dulski M., Dudek K., Chalon D., Kubacki J., Sulowicz S., Piotrowska-Seget Z., Mrozek-Wilczkiewicz A., Gawecki R., Nowak A. Toward the Development of an Innovative Implant: NiTi Alloy Functionalized by Multifunctional $\beta\text{-TCP} + \text{Ag}/\text{SiO}_2$. *Coatings ACS Applied Bio Materials*, 2019, vol. 2, no. 3, pp. 987-998. DOI: 10.1021/acsabm.8b00510.
6. Al-Terehi M.N., Alkaim A.F. Role of nanoparticles applications as a model in DNA technologies; a review Indian. *Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 2019, vol. 13, no. 4, pp. 855-860. DOI: 10.5958/0973-9130.2019.00402.X.
7. Arriagada F., Nonell S., Morales J. Silica-based nanosystems for therapeutic applications in the skin. *Nanomedicine*, 2019, vol. 14, no. 16, pp. 2243-2267. DOI: 10.2217/nnm-2019-0052.
8. Sun G., Zeng S., Liu X., Shi H., Zhang R., Wang B., Zhou C., Yu T. Synthesis and Characterization of a Silica-Based Drug Delivery System. *Spinal Cord Injury Therapy Nano-Micro Letters*, 2019, vol. 11, no. 1, p. 23. DOI: 10.1007/s40820-019-0252-6.
9. 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. DOI: 10.1023/A:1025334707409.
10. 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. DOI: 10.1007/s11094-008-0138-2.

11. 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.)]
12. Kim H.M., Noh Y.J., Yu J., Kim S.Y., Youn J.R., Silica aerogel/polyvinyl alcohol (PVA) insulation composites with preserved aerogel pores using interfaces between the superhydrophobic aerogel and hydrophilic PVA solution. *Composites: Part A*, 2015, vol. 75, pp. 39-45. DOI: 10.1016/j.compositesa.2015.04.014.
13. Luo Y., Li Z., Zhang W., Rapid synthesis and characterization of ambient pressure dried monolithic silica aerogels in ethanol/water co-solvent system. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2019, vol. 503-504, pp. 214-223. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2018.09.049.
14. Baetens R., Jelle B.P., Gustavsen A., Aerogel insulation for building applications: a state-of-the-art review. *Energy and Buildings*, 2011, vol. 43, pp. 761-769. DOI: 10.1016/j.enbuild.2010.12.012.
15. 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. et al. *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.)]
16. Velyaev Y.O., Zakharov V.I., Maiorov D.V. Improvement of the technology for the synthesis of an aluminosilicate coagulant-flocculant based on nepheline. *Glass Physics and Chemistry*, 2011, vol. 37, no. 5, pp. 568-571. DOI: 10.1134/S1087659611050154.
17. 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.)]
18. Velyaev Y., Maiorov D., Kometiani I. Research on Obtaining Silica Xerogels from Nepheline and Study of some of their Physical and Chemical Properties. *MSF*, 2020, vol. 989, pp. 121-126. DOI: 10.4028/www.scientific.net/MSF.989.121.
19. Gregg S.J., Sing K.S.W. Adsorption, surface area and porosity, second ed. *Surface chemistry, Academic press*, 1982.

INVESTIGATION OF SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF NEPHELINE CONCENTRATE BASED SILICON SORBENTS

Velyaev Yu.O.¹, Maiorov D.V.²

¹ Sevastopol State University,

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

² Tananaev Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Mineral Raw Materials,
Kola Science Center Russian Academy of Sciences,
Akademgorodok, 26a, Apatity, 184209, Russia

Abstract. The paper shows the possibility of obtaining high-performance silicon sorbents based on acid decomposition of nepheline concentrate with specified structural and surface properties – specific surface area and volume, particle diameter, etc. The physical and chemical properties of silicon dioxide samples obtained by decomposition of nepheline concentrate with nitric and sulfuric acids are given, and it is proposed to use the systems H₂SO₄-H₂O and H₂SO₄-C₂H₅OH when opening nepheline with a solution of sulfuric acid. Data on sorption-desorption and distribution of pore volume by their diameter of the SiO₂ samples obtained are given. Conclusions are made about the type and shape of the pores prevailing in the samples. It is shown that both meso- and micro- and macroporous silicas with a developed specific surface area (285÷600 m²/g) can be obtained from nepheline. It is concluded that silicon sorbents with controlled structural and surface properties can be obtained on the basis of nepheline concentrate.

Key words: *amorphous silicon dioxide, nepheline, sorption, BET surface area, porous structure.*

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛУГОВО-ЧЕРНОЗЕМНЫХ ПОЧВ БЕЛОГОРСКОГО РАЙОНА, РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

Дубас В.В.¹, Алексахин И.В.¹, Мосунов А.А.², Якимова К.В.²

¹Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского
пр. Академика Вернадского, 4, г. Симферополь, 295007, РФ; e-mail: victoriadubas.VD@gmail.com

²Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию: 09.07.2020

Аннотация. В настоящей работе рассматриваются вопросы исследования качественных характеристик лугово-черноземных почв Белогорского района, Республики Крым. С помощью методов ИК- и рамановской спектроскопии достоверно установлено, что в анализируемых почвах происходит качественное и количественное изменение компонентного органик-неорганического состава. ИК-спектроскопия позволила выявить различия в минералогическом составе почв не только в пространственном отношении, но и с глубиной. Среди минералов явно определяются первичные (кальцит, кварц и гипс) и вторичные (глинистые) минералы – монтмориллонит, каолинит, галлузит, глауконит и сапонит. Во всех образцах представленные минералы образуют определенные ассоциации. Об образовании геохимических барьеров можно судить лишь косвенно, основываясь на полученных результатах ИК-спектроскопии. Так, в лугово-черноземных почвах, образованных на глинистых породах наиболее вероятно образование сорбционных барьеров в пределах С(D) горизонтов в то время как в почвах, образованных на высококарбонатных породах высока вероятность образования щелочных барьеров. Следует также учитывать возможность существования в пределах одного почвенного разреза нескольких геохимических барьеров. Качественные компонентные характеристики также позволяют предопределять миграционные процессы веществ не только в твердой форме, но и в ионной. Этому способствует понимание процессов координации молекул в анализируемых веществах и возможности присоединения к ним сопутствующих катионов и/или анионов. С помощью рамановской спектроскопии доподлинно установлено присутствие в почвах из Мельничного сельского поселения полимерных соединений принадлежащих ПВХ. Полученная информация позволяет говорить о высокой эффективности метода в установлении степени загрязнения почв микропластиком.

Ключевые слова: лугово-черноземные почвы, минералы, микропластик, гумус, ИК-спектроскопия, рамановская спектроскопия, Белогорский район.

Распространение лугово-черноземных почв на территории Белогорского района приурочено главным образом к долинам рек и ручьев, а повышенное содержание гумуса и дополнительная увлажненность предопределили их использование в сельском хозяйстве, главным образом под сады и пашню. При интенсивном антропогенном воздействии на почвы в нее поступают различные химические элементы чаще всего негативно влияющие на плодородие почв и качество получаемой продукции. Однако для понимания механизмов воздействия на почвы и их последствия следует для начала рассмотреть химический состав твердой почвенной фазы, параметры миграции отдельных ее компонентов, а также возможность их трансформации и аккумуляции в зависимости от различных экзогенных и эндогенных факторов окружающей среды.

Целью проведения исследований было изучение особенностей органического и неорганического состава твердой фазы лугово-черноземных почв Белогорского района, процессов их миграции и аккумуляции в пределах почвенного профиля методами колебательной спектроскопии.

Использование спектральных методов в анализе лугово-черноземных почв в значительной мере упрощает определение их компонентного (различные минералы и органические и/или неорганические включения антропогенного происхождения) состава и позволяет проследить его изменение с глубиной, на основании чего становится возможным определение наличия и/или отсутствия в пределах почв зон перераспределения и аккумуляции твердых частиц и сопутствующих им ионов – геохимических барьеров. Значительным преимуществом спектральных методов является быстрота их действия в получении результатов, работа с малым количеством исходного образца, что позволяет исследовать микровключения, и относительная простота в работе с технико-технологической точки зрения. Современное развитие науки и техники добавило еще одно преимущество спектральным методам анализа – мобильность, что позволяет проводить исследования и получать мгновенные результаты в полевых условиях. Все это позволяет использовать методы колебательной спектроскопии в качестве методов экспресс-анализа твердых веществ.

Получаемая в ходе анализа информация является актуальной для множества сфер деятельности. Так, данные могут быть использованы для целей экологического и агрохимического мониторинга, создания региональной и локальной баз данных различной направленности, а также при решении прикладных задач, возникающих в ходе ведения сельскохозяйственной и иной деятельности (например, при повышении плодородия за счет внесения тех или иных удобрений, что приводит к качественным изменениям химического состава или при переводе земель,

ранее использовавшихся под полигон твердых коммунальных отходов (санкционированный и несанкционированный), прошедших этап рекультивации в категорию земель сельскохозяйственного назначения).

Незначительным на фоне рассмотренных выше преимуществ недостатком является малая изученность почв настоящими методами не только в пределах РФ, но и во всем мире, что сопровождается наличием малого количества литературных и практических сведений и затрудняет дальнейшую интерпретацию полученных результатов, а также увеличивает количество затрачиваемого времени на проведение исследований. Кроме того, обнаружить сведения о проведении аналогичных исследований на территории Крымского полуострова нам не удалось, что позволяет предположить о новизне настоящей работы в Крымских реалиях. В тоже время возникшую проблему возможно решить уже сейчас, собрав необходимое количество практического материала и создав на его основе спектральную базу данных, а ее электронное представление позволит ускорить процесс расшифровки спектров. А пока, ввиду недостаточной изученности раскрываемой темы, в качестве литературной базы нами использовались существующие книги и статьи по ИК-спектроскопии (далее – ИКС) и рамановской спектроскопии (далее – КРС) органических и неорганических соединений как отечественных, так и зарубежных авторов.

Объектом исследования в настоящей работе выступают лугово-черноземные почвы Белогорского района, Республики Крым, приурочены к пойменным и надпойменным террасам таких рек как Бурульча, Биюк-Карасу и Кучук-Карасу. Аналогичные почвы были обнаружены и в пределах долины безымянного ручья, расположенного в границах Русаковского сельского поселения (далее – СП).

Отбор проб производился в летний период 2018 г., на территории следующих СП:

- Мельничного – около 1,5 км южнее в пределах пойменной террасы р. Бурульча;
- Русаковского – приблизительно в 500 м южнее с. Луговое в долине безымянного ручья;
- Зыбинского – в 100 м южнее юго-западной границы села Зыбино, в непосредственной близости к р. Биюк-

Карасу;

- Мичуринского – в черте населенного пункта (восточная окраина), в окрестностях р. Кучук-Карасу.

Алгоритм отбора проб первоначально состоял в создании почвенного профиля и его описании, в ходе которого выделялись характерные почвенные горизонты и подтверждалась типовая принадлежность почв. После этого, предназначенные для проведения спектрального анализа смешанные пробы массой около 50 г., отбирались каждая в зависимости от выделенного почвенного горизонта с примерно одинаковой глубины. Затем пробы высушивались при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния. Для ИК-спектрального анализа почвенные образцы измельчались до мелкодисперсного состояния в агатовой ступке.

ИК-спектральный анализ полученных проб проводился при комнатной температуре с помощью ИК-Фурье спектрофотометра Spectrum Two, производства компании PerkinElmer, в диапазоне $4000-400\text{ см}^{-1}$ на базе кафедры физической и неорганической химии КФУ им. В.И. Вернадского. Исследование органической составляющей обнаруженных в почвах микровключений производилось с помощью 3D сканирующего лазерного рамановского спектрометра Confotec NR500, который находится в лаборатории молекулярной и клеточной биофизики СевГУ. Образец почвы помещался тонким слоем на предметный стол. Регистрация КР-спектров производилась посредством лазера в красном диапазоне с длиной волны 532 нм. Собранные микрообъективом микроскопа излучение отклика образца, пройдя в обратном ходе через XY гальвано-сканер, направляется на Edge фильтр, блокирующий лазерное излучение и пропускающий рамановское или люминесцентное излучение. Затем, с помощью программы “NanoSP”, включающей две вспомогательных программы: ImageSP и CubeSP полученный сигнал трансформируется в спектр. Также спектрометр позволил получить качественные микрофотографии образцов почвы, наиболее репрезентативная из которых представлена в настоящей статье.

Лугово-черноземные почвы в пределах Белогорского района сформированы под лугово-степной растительностью с преобладанием разнотравья и/или разреженных древесных лиственных видов растений. Главной особенностью формирования исследуемых почв является постоянное увлажнение почвенных горизонтов за счет воздействия близко залегающих грунтовых вод и периодически выпадающих осадков. Настоящие параметры оказывают непосредственное воздействие на формирование морфологического строения заложенных почвенных профилей, характеристика которых представлена на рисунке 1.

Главное морфогенетическое отличие представленных почв кроется в почвообразующих породах, которые в зависимости от местоположения почвы представлены [2]:

- современными аллювиальными отложениями (aQIV), которые приурочены к руслам и поймам рек, надпойменным террасам и сложенные гравийно-галечниковыми отложениями с суглинистым заполнителем – Мельничное СП;
- верхнемиоценовыми отложениями Сарматского яруса (N1s), которые представлены оглееными глинами – Русаковское СП;
- отложениями среднего миоцена (N12), которые представлены глинами и суглинками – Зыбинское СП;
- отложениями верхнего мела (Cr2cm), которые сложенные мергелем – Мичуринское СП.

Об исследовании горных пород и минералов, распространенных в пределах Белогорского района методами колебательной спектроскопии более подробно изложено в [1, 3, 4]. Основная задача, возлагаемая на методы колебательной спектроскопии в изучении почвенных профилей, заключалась в получении сведений о компонентном (органическом и неорганическом) составе каждого из почвенных горизонтов на макро- и микроуровне, что позволит выявлять особенности геохимической миграции твердой части и некоторые функциональные особенности почв.

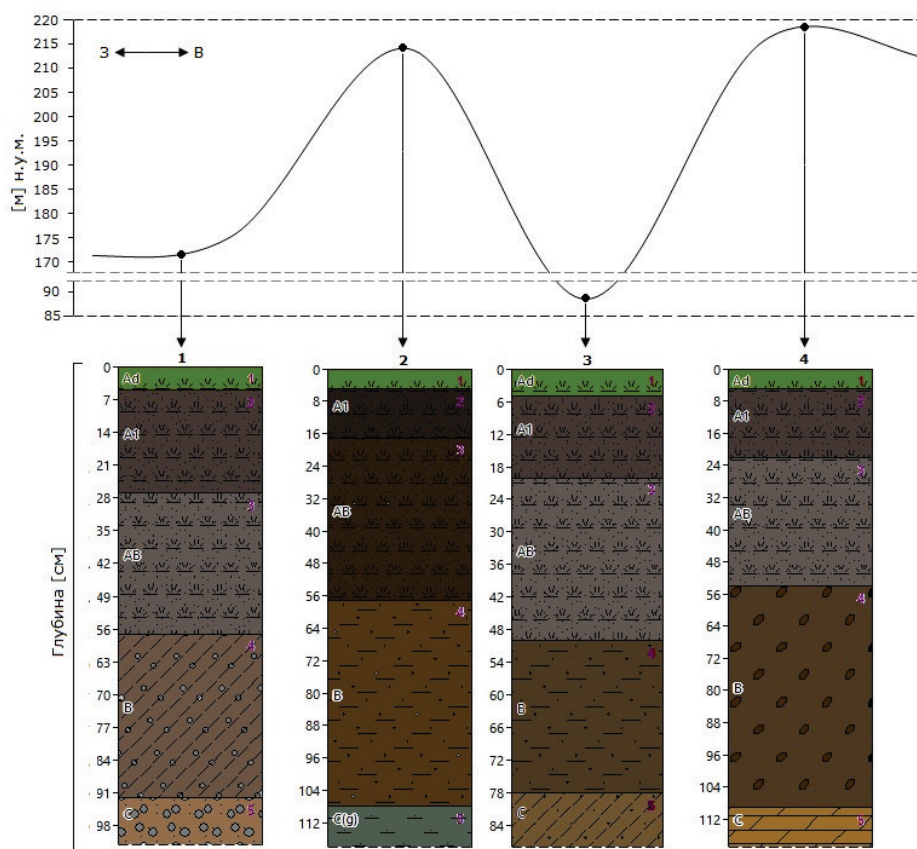


Рисунок 1. Морфогенетические особенности лугово-черноземной почвы распространенной в пределах СП Белогорского района: 1 – Мельничного; 2 – Русаковского; 3 – Зыбинского; 4 – Мичуринского

По результатам ИК-спектрального анализа были установлены достаточно обширные сведения об исследуемых образцах. Для всех полученных ИК-спектров образцов целесообразно выделять несколько областей пропускания: валентные колебания для О-Н групп обнаруживаются в области $3750-2000\text{ см}^{-1}$, для С-О групп характерно наличие полос пропускания в пределах $1450-1410\text{ см}^{-1}$, а для Si-O групп полосы проявляются в пределах $1250-830\text{ см}^{-1}$ [6]. По положению полосы пропускания валентных колебаний силикатов можно судить о степени полимеризации тетраэдров $[\text{SiO}_4]$ и выявлять структуру кремнекислородных групп. Однако в той же области могут быть отражены и деформационные колебания фрагментов соединений Al-O-H [6]. Деформационные колебания, характерные для С-О групп проявляются в пределах $880-860\text{ см}^{-1}$ и $750-710\text{ см}^{-1}$, в частности наличие полос пропускания в пределах последней области позволяет определять конкретный минерал среди карбонатов кальция [5]. Так, пик пропускания при $715\pm 5\text{ см}^{-1}$ обуславливается наличием в составе исследуемого образца кальцита (CaCO_3). Для Si-O групп характерной областью пропускания деформационных колебаний является $500-400\text{ см}^{-1}$ [6]. По полученным ИК-спектрам всех образцов можно также предположить о наличии в их составе α -кварца ($\alpha\text{-SiO}_2$), о чем свидетельствуют следующие полосы пропускания: дублет расположенный в области $777-795\pm 5\text{ см}^{-1}$, а также полосы в интервале $695\pm 5\text{ см}^{-1}$ и $520\pm 5\text{ см}^{-1}$ [6]. Отдельно следует отметить наличие полос пропускания в интервале $3500-3300\text{ см}^{-1}$ и $1680-1580\text{ см}^{-1}$, которые характерны для валентных и деформационных колебаний ОН- групп свободной и связанной воды [6, 10].

Различия, наблюдаемые в интенсивности проявляемых полос пропускания согласно закону Бугера-Ламберта-Бера являются прямо пропорциональными концентрации того или иного вещества в составе исследуемого образца, что позволяет проследить в почве косвенные изменения с глубиной содержания минеральной фазы почв. Особое внимание следует уделить почвообразующим породам, которые значительно отличаются от общего количества ИК-спектров не только интенсивностью, но и отсутствием или наличием различных функциональных групп. Все эти особенности отражены ниже для каждого из почвенных разрезов.

На рисунке 2 отражены ИК-спектры каждого из горизонтов почвенного профиля, расположенного западнее остальных, в пределах Мельничного СП. Согласно представленным пикам поглощения для всех почвенных горизонтов характерно наличие минерала группы карбонатов кальция – кальцита, а также группы силикатов – кварца. Вторичные минералы отчетливо определяются лишь в горизонте В и представлены глинистым минералом, предварительно монтмориллонитом. В пределах данного почвенного горизонта также обнаруживаются слабые по интенсивности полосы поглощения характерные для органических веществ, включающих в свой состав С-Н связи.

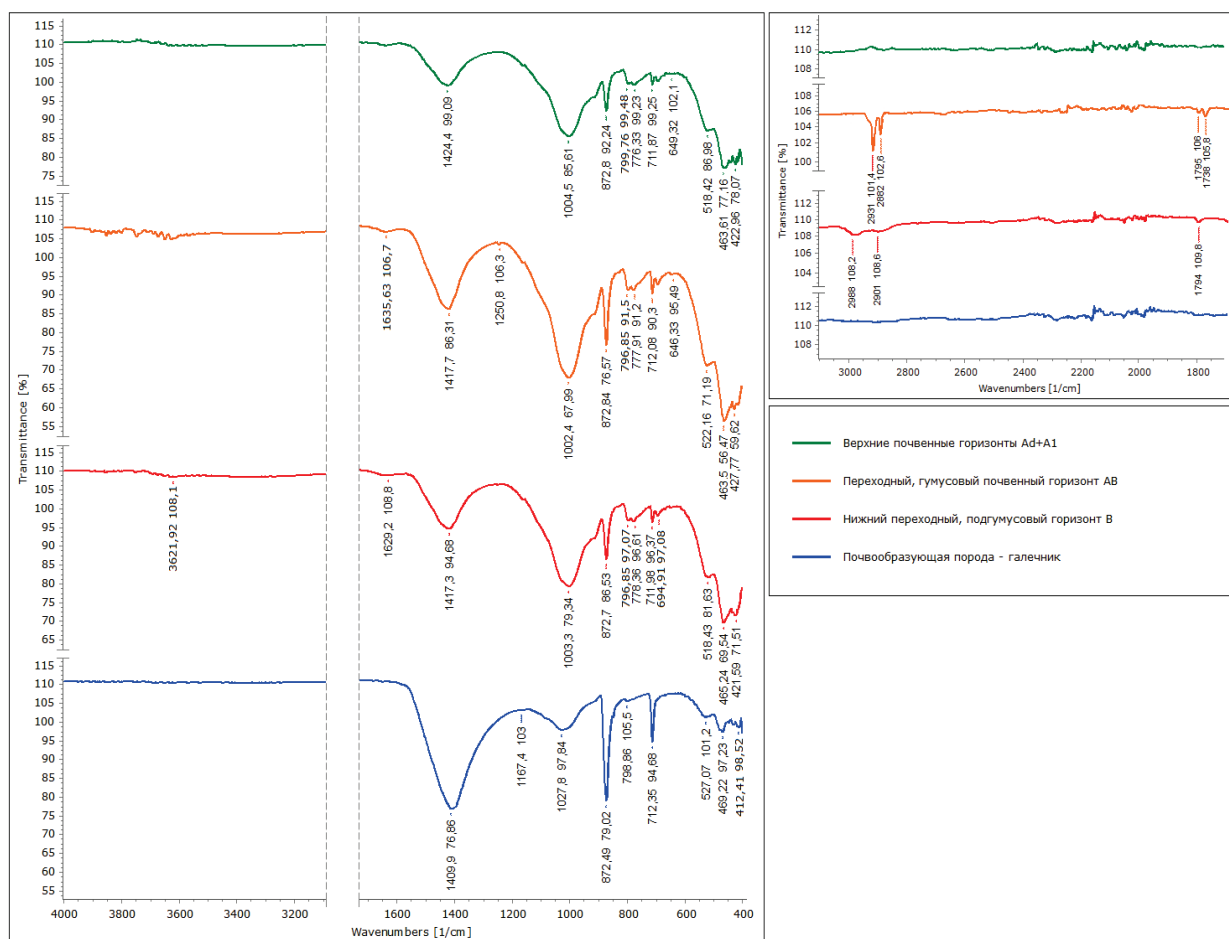


Рисунок 2. ИК-спектры образцов лугово-черноземной почвы из профиля в пределах Мельничного СП

Наличие сторонних органических соединений, принадлежащих веществам синтетического происхождения может быть обусловлено загрязнением почв полимерами и изделиями из них, точнее образовавшимся в ходе их старения и деструкции микропластиком, наиболее опасным для экосистем. Более подробная характеристика проведенного качественного анализа ИК-спектров отражена в таблице 1.

Наличие в карбонатной подстилающей породе – галечнике незначительных по интенсивности полос пропускания соответствующих Si-O связям кремнекислородного каркаса на фоне полос, относимых к C-O связям в структуре CaCO_3 обуславливается примесью кремнезема, содержащегося в С горизонте в качестве суглинистого заполнителя рыхлой, несцементированной осадочной породы.

Видимые различия в интенсивности характеристической для C-O связей в карбонатах кальция полосы пропускания среди представленных ИК-спектров каждого почвенного горизонта свидетельствуют о возможности существования миграции минералов группы карбоната кальция на глубину, доступную при промачивании почв по время дождей. Резкое увеличение содержания карбонатов кальция на глубине около 90 см позволяет предположить об образовании щелочного барьера на границе В и С горизонтов. В складывающихся условиях следует также учитывать возможность миграции и осаждения сопутствующих аниогенных элементов, обладающих повышенной активностью в щелочной среде.

Вопрос существующего загрязнения почв микропластиком выявленного в ходе ИК-спектрального анализа, может быть детально изучен и подтвержден методом КРС с дополнением в виде микроскопии высокого расширения. Находясь в природе микропластик представляет собой полимерные частицы, размером около 5 мм

Таблица 1. Качественная характеристика ИК-спектров почвенного разреза из Мельничного СП

Химическая связь	Волновое число, см^{-1}		Соотнесение с веществом
	Валентные колебания	Деформационные колебания	
Al-Al-OH	3622	~915 (плечо)	Монтмориллонит (неорг.)
C-H (-CH ₂)	2988, 2901	1251	Гумусовые кислоты
C-H	2931, 2882	1738	Поливинилхлорид (ПВХ)
H-O-H	-	1630-1635	Вода
C-O в $[\text{CaCO}_3]$	1410-1430	1795-1797, 872, 712	Кальцит (неорг.)
Si-O(-Si)	1000-1030	646-649, 463-469, 428	Кремнекислородный каркас
Si-O в $[\text{SiO}_2]$	776-799 (дублет)	695, 518-527	Кварц (неорг.)

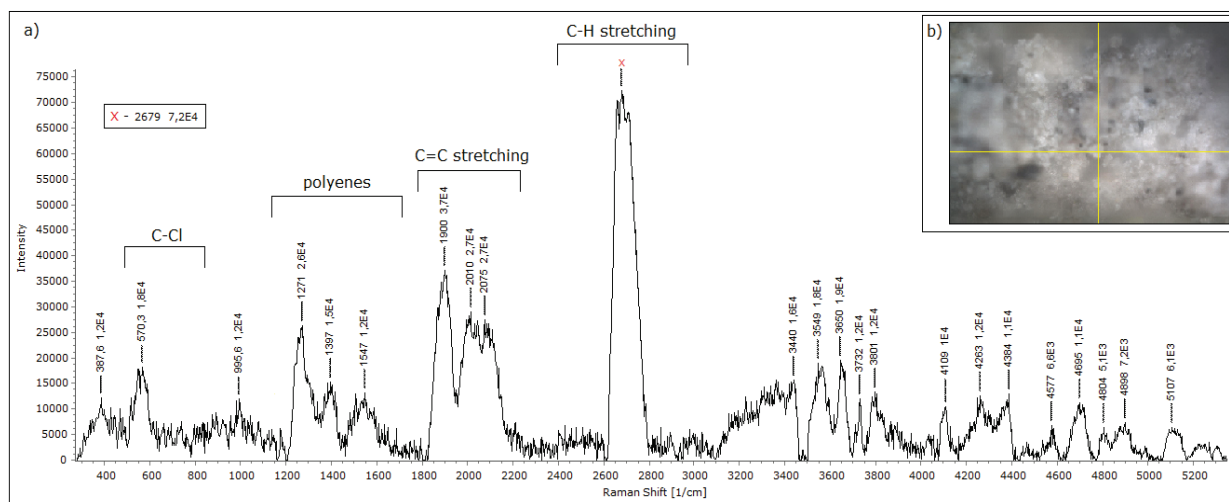


Рисунок 3. а) КР-спектр микровключения из АВ горизонта лугово-черноземной почвы (Мельничного СП);
 б) микрофотография образца почвенного материала из АВ горизонта с заданной точкой для снятия КР-спектра

и менее, поэтому человеческому глазу он в большинстве случаев незаметен. Его малые размеры позволяют свободно проникать в межпоровые пространства почв и осуществлять миграцию не только в пределах почвенного профиля, но и за его пределы. Особую опасность для экосистем представляют те виды пластика, которые в результате деструкции могут выделять токсические вещества, например, достаточно распространенный на рынке пластмасс полистирол может выделять ядовитый газ – стирол, а некоторые виды пластика в производстве которых в качестве отвердителя применялся бисфенол А, могут выделять в почвенную среду это ядовитое вещество, способное накапливаться и мигрировать в смежные среды, попадая по трофическим цепям в организмы живых существ, приводя к гормональным сбоям. Кроме того, некоторые ученые в своих работах [7-9] указывают на то, что как на поверхности макропластиков, так и на поверхности микропластиков, свою жизнедеятельность могут осуществлять различные микроорганизмы (бактерии, вирусы и др.), что способствует их накоплению, миграции между средами и образованию различных очагов болезней у флоры и фауны, включая человека.

Достоверность результатов по выявлению полимеров в неоднородной органик-неорганической среде с помощью метода рамановской спектроскопии находится на достаточно высоком уровне, что связано в первую очередь с возможностью задавать исходную область для спектрального исследования представленного образца и таким образом изучать отдельные его участки выявляя в составе микровключения различного генезиса. Кроме того, однородность структуры и состава микропластика позволяет определять его вид вне зависимости от смещения задаваемой для получения рамановского спектра точки. Таким образом, в ходе детального изучения компонентного состава почвенного образца из АВ горизонта почвенного разреза, заложенного в пределах Мельничного СП методом КРС, было подтверждено наличие частиц органического происхождения (рис. 3).

В ходе проведенной интерпретации рамановских спектров было установлено, что данные частицы относятся к поливинилхлориду (ПВХ) подверженному n-стадии разложения. В данном случае, характеристическими для ПВХ выступают полосы при 570 см^{-1} , $1271\text{--}1547\text{ см}^{-1}$, $1900\text{--}2075\text{ см}^{-1}$ и 2679 см^{-1} . Наличие полос комбинационного рассеяния в области $3440\text{--}5107\text{ см}^{-1}$ может соответствовать Н-Сл связям свидетельствующих об образовании полиенов и деструкции ПВХ под воздействием мощности лазера.

В отличие от предыдущего разреза на ИК-спектрах образцов из почвенного профиля заложенного в пределах Русаковского СП (рис. 4) отсутствую какие-либо полосы в области пропускания С-Н групп в органических соединениях, а по всем горизонтам четко определяются ОН-группы характерные для глинистых минералов. В природных условиях глины являются поликомпонентными несцементированными породами, в состав которых помимо наиболее распространенных сопутствующих им минералов (кальцит, кварц) входят различные ассоциации, состоящие из частиц собственно глинистых минералов разного размера. Поэтому на ИК-спектрах настоящего почвенного разреза можно обнаружить качественное изменение состава вторичных глинистых минералов и образование глинистых ассоциаций. В верхних (А, АВ) почвенных горизонтах они представлены глинистыми частицами смектитовой группы, преимущественно монтмориллонитом. В подгумусовом В горизонте одновременно присутствуют частицы двух глинистых минералов смектитовой группы – монтмориллонита (трехслойная структура, типа 2:1) и сапонит (триоктаэдрическая структура). По большей интенсивности характеристических для монтмориллонита полос пропускания можно судить о его преобладающей роли в монтмориллонит-сапонитовой ассоциации.

В глине из горизонта почвообразующей породы (С_{Ca}) обнаруживаются минерал каолиновой группы – галлазит со структурой кристаллической решетки 1:1. Более подробные результаты качественного ИК-спектрального анализа представлены в таблице 3.

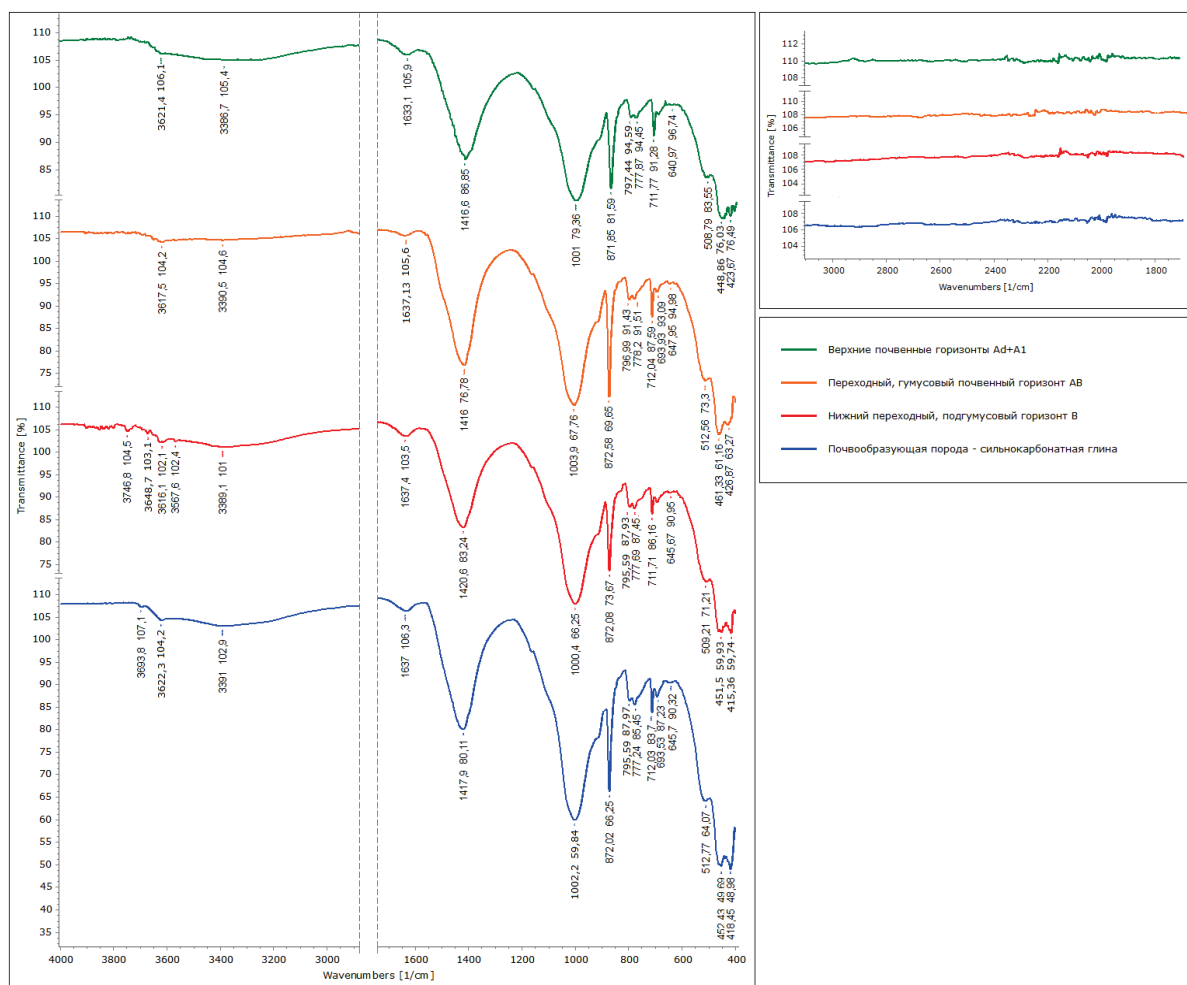


Рисунок 4. ИК-спектры образцов лугово-черноземной почвы из профиля в пределах Русаковского СП

В тоже время в почвообразующей породе из почвенного разреза расположенного в пределах Зыбинского СП обнаруживается монтмориллонит-глауконитовая глинистая ассоциация. Подстилающая порода здесь представлена сильнокарбонатной суглинисто-песчаной глиной, на ИК-спектрах которой обнаруживается пик пропускания около 3535 см^{-1} , что соответствует валентным колебаниям Me-OH (где Me – катионы металлов, например, Al^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+}) связей в глинах гидрослюдистого типа. Более подробная качественная ИК-спектральная характеристика настоящего почвенного разреза представлена в таблице 4.

Гидрослюды отличаются от других глинистых минералов повышенным содержанием химически связанной воды, что обусловлено обязательным условием их образования и дальнейшего существования – содержанием большого количества воды в почвенной среде. Минералы гидрослюдистой группы по своей структуре представляют трехслойные алюмосиликаты, состоящие из двух тетраэдрических и одного октаэдрического слоя между ними. Каждый слой отделяет друг от друга пространство, заполненное помимо катионов K^{2+} ионами H_3O^+ , H_2O и $\text{Mg}(\text{OH})^+$. На ИК-спектрах это отражено большей интенсивностью валентной ($\sim 3400\text{ см}^{-1}$) и деформационной ($\sim 1630\text{ см}^{-1}$) полос пропускания характерных для OH-групп водных соединений (рис. 5). Помимо глинистых минералов в состав почв на постоянной основе входят кальцит и кварц.

Таблица 3. Качественная характеристика ИК-спектров почвенного разреза из Русаковского СП

Химическая связь	Волновое число, см^{-1}		Соотнесение с веществом
	Валентные колебания	Деформационные колебания	
Si-OH	3747	~ 740 (плечо)	Сапонит (неорг.)
Mg-OH в $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$	3649	~ 830 (плечо)	
H-O-H	3568	-	
OH-внешние	3694	-	Галлуазит (неорг.)
OH-внутренние	3622	-	
Al-Al-OH	3616-3621	~ 915 (плечо)	Монтмориллонит (неорг.)
H-O-H	3387-3391	1633-1637	Вода (свободная и связанная)
C-O в $[\text{CaCO}_3]$	1416-1421	872, 712	Кальцит (неорг.)
Si-O(-Si)	1000-1004	640-648, 449-461, 415-427	Кремнекислородный каркас
Si-O в $[\text{SiO}_2]$	777-797 (дублет)	693-695, 509-513	Кварц (неорг.)

Таблица 4. Качественная характеристика ИК-спектров почвенного разреза из Зыбинского СП

Химическая связь	Волновое число, см ⁻¹		Соотнесение с веществом
	Валентные колебания	Деформационные колебания	
Al-Al-OH	3618-3620	~915 (плечо)	Монтмориллонит (неорг.)
Al-OH	3634	-	Глауконит (неорг.)
H-O-H	3370-3410	1633-1637	Вода (свободная и связанная)
C-O в [CaCO ₃]	1417-1428	872, 712	Кальцит (неорг.)
Si-O-(Si)	996-1003	645-650, 445-464, 413-427	Кремнекислородный каркас
Si-O в [SiO ₂]	777-799 (дублет)	693-695, 518-527	Кварц (неорг.)

Глинистые почвообразующие породы по своей природе обладают повышенными сорбционными свойствами, накапливая в межплоскостных пространствах кристаллической решетки различные ионы, преимущественно металлов. Интенсивность и максимальная емкость поглощения напрямую зависит от физико-химических свойств почвенной среды и способности кристаллической решетки к раздвижению и увеличению объема межплоскостных пространств. Однако, вне зависимости от этого все вышеперечисленные глины выступают в качестве сорбционного геохимического барьера, в пределах которого скапливаются мигрирующие вниз по профилю частицы карбоната кальция и кварца, а также сопутствующие им катионогенные и анионогенные химические элементы.

Особенностью лугово-черноземных почв, образованных на мергелистых породах является наличие на ИК-спектре подстилающей породы (рис. 6) раздвоенной полосы пропускания (дублета) в пределах 1000-1100 см⁻¹ и отсутствие дублета характерного для кварца (775-795±5 см⁻¹), что характерно для Si-O-(Si) связей в минералах с аморфной структурой.

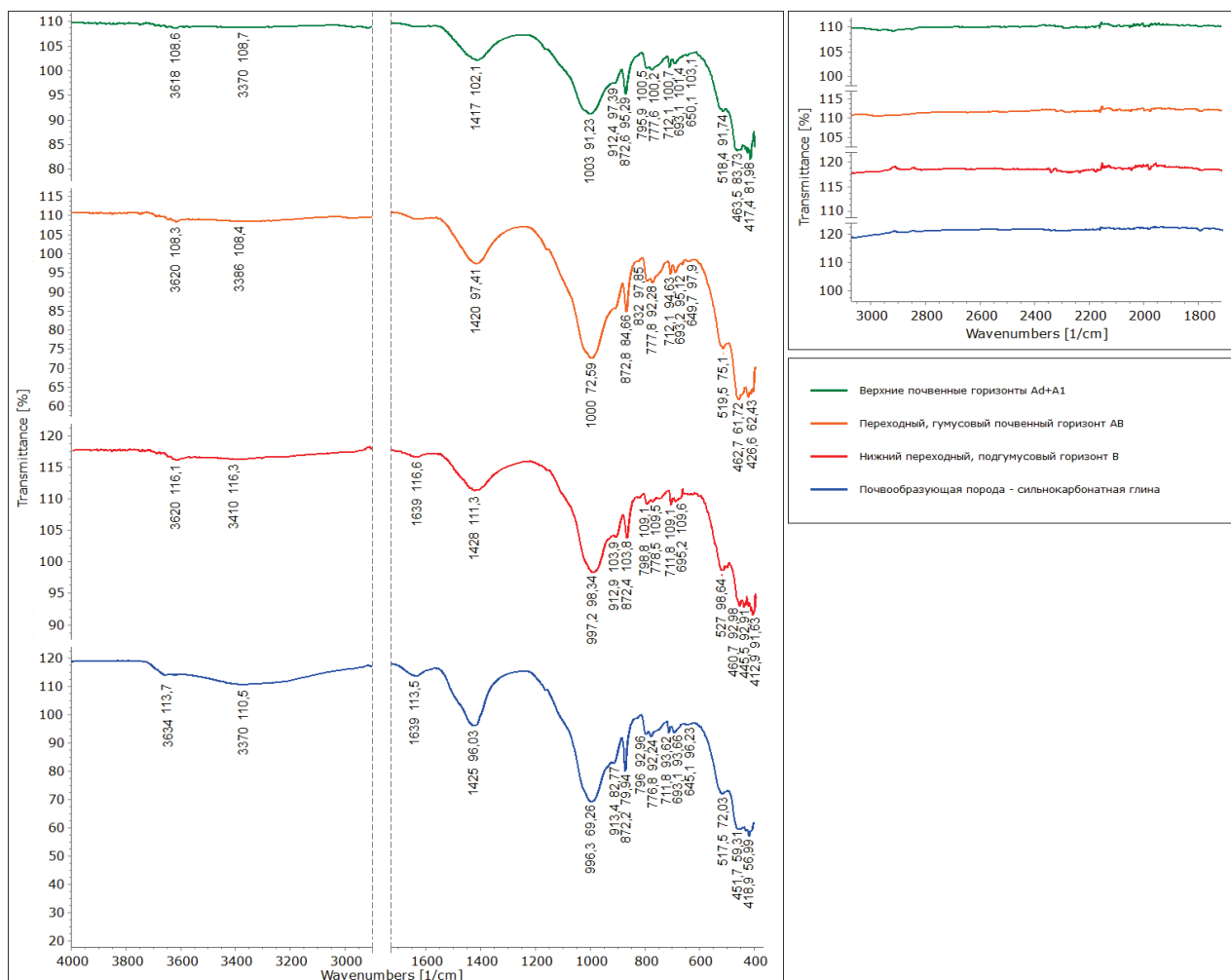


Рисунок 5. ИК-спектры образцов лугово-черноземной почвы из профиля в пределах Зыбинского СП

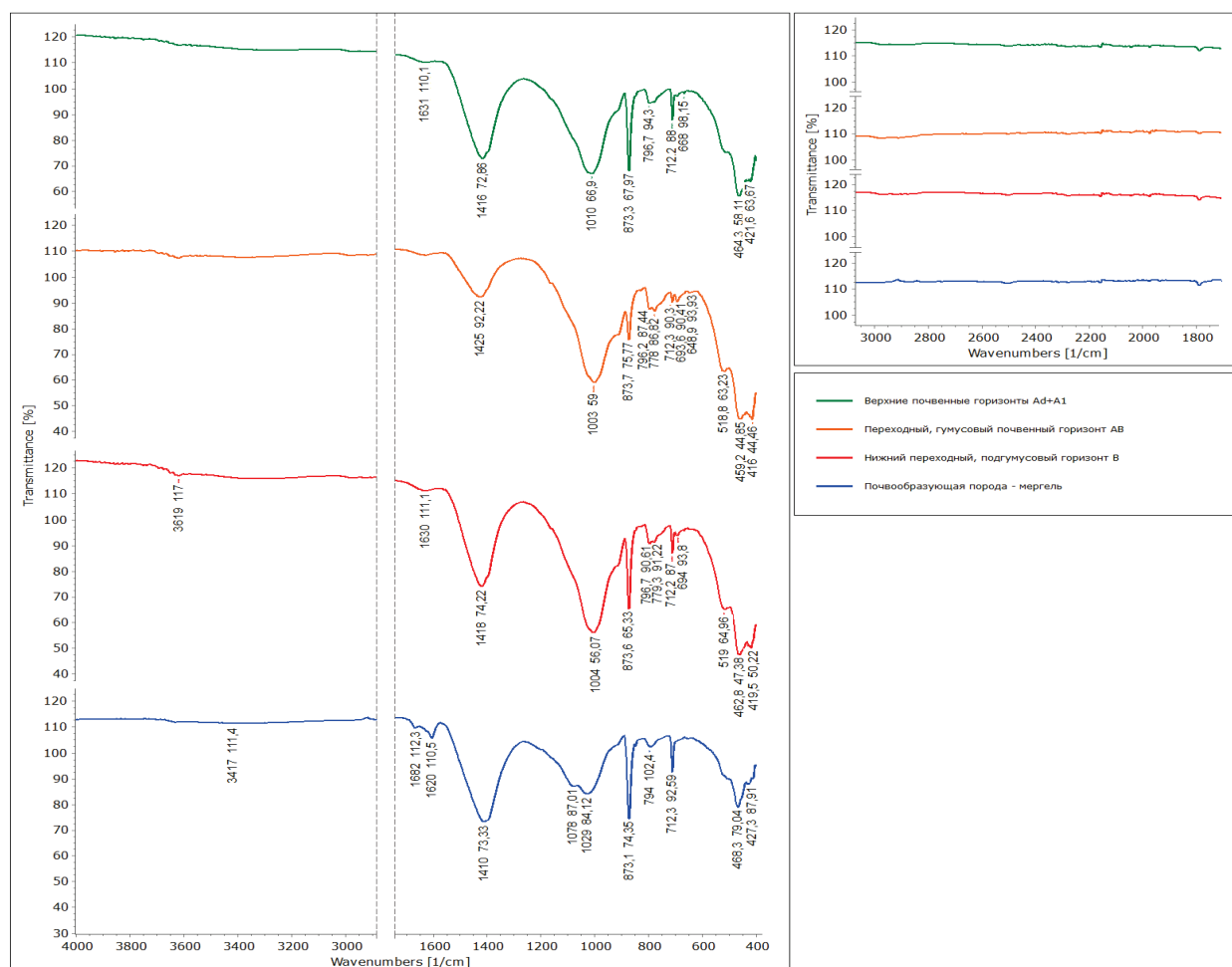


Рисунок 6. ИК-спектры образцов лугово-черноземной почвы из профиля в пределах Мичуринского СП

В мергеле из почвенного разреза, заложенного в пределах Мичуринского СП наблюдаются прожилки прозрачного слоистого минерала, которые согласно полученному ИК-спектру соответствуют гипсу. Об этом свидетельствует удвоенная полоса пропускания в области деформационных колебаний Н-О-Н связей, каждая из которых отвечает за колебания в разных молекулах. Таким образом, подстилающая порода является гипсовым мергелем, образуя гипсово-мергелистую ассоциацию. Более подробная качественная ИК-спектральная характеристика представлена в таблице 5.

Таким образом, в заключение следует отметить о высокой эффективности применяемых методов колебательной спектроскопии в вопросах установления загрязнения почв микропластиком. Кроме того, в данном вопросе применение рамановской (КР-) спектроскопии с расширением в виде микроскопа высокого расширения более действенно, в отличие от ИК-спектроскопии, одновременно анализирующей смесь вещества. ИК-спектроскопия позволила установить минералогический состав лугово-черноземной почвы Белогорского района, Республики Крым и его изменение с глубиной. Качественно установлено, что в почвах содержатся первичные (кварц, кальцит, гипс) и вторичные глинистые (монтмориллонит, каолинит, глауконит, галлуазит, сапонит) минералы. В качественном установлении органических кислот, преимущественно гумусовых без предварительной пробоподготовки могут использоваться лишь образцы почв, обладающих высоким процентом их содержания. Поэтому применять в данном случае методы колебательной спектроскопии не имеет смысла. Получив результаты спектрального анализа становится возможным судить о миграции, аккумуляции и

Таблица 5. Качественная характеристика ИК-спектров почвенного разреза из Мичуринского СП

Химическая связь	Волновое число, см ⁻¹		Соотнесение с веществом
	Валентные колебания	Деформационные колебания	
Al-Al-OH	3619	~915 (плечо)	Монтмориллонит (неорг.)
Н-О-Н	3370-3410	1630-1631	Вода (свободная и связанная)
		1620-1682 (дублет)	Вода в гипсе (неорг.)
С-О в [CaCO ₃]	1410-1425	872, 712	Кальцит (неорг.)
Si-O(-Si)	1003-1010	649, 445-464, 413-427	Кремнекислородный каркас
	1029-1078 (дублет)		Аморфный кремнезем
Si-O в [SiO ₂]	777-799 (дублет)	693-695, 518-527	Кварц (неорг.)

образовании геохимических барьеров. Последние в одних и тех же типах почв, но образованных на различных породах возможно существование разных геохимических барьеров. Так, в лугово-черноземных почвах, образованных на глинах вероятнее всего образование щелочных барьеров, в то время как в аналогичных почвах, развитых на карбонатных породах высока вероятность существования щелочных барьеров. Однако утверждать об этом не иначе как косвенно не представляется возможным.

Список литературы / References:

1. Алексашкин И.В., Гусев А.Н., Дубас В.В. *Спектральные исследования глинистых отложений заповедного урочища «Горно-лесной массив в с. Курское и с. Тополевка»*. Заповедники – 2019. Биологическое и ландшафтное разнообразие, охрана и управление. Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции (Симферополь, 9-11 октября 2019 г.). Симферополь: ИТ «Ариал», 2019, с. 145-150. [Aleksashkin I.V., Gusev A.N., Dubas V.V. *Spectral studies of clay deposits of the reserve tract "Mountain-forest massif in the village Kurskoe and village Topolevka"*. Zapovedniki – 2019. Biologicheskoe i landshaftnoe raznoobrazie, ohrana i upravlenie. Materialy IX Vserossiyskoj nauchno-prakticheskoy konferencii (Simferopol', 9-11 oktyabrya 2019 g.). Simferopol: IT «Ariall», 2019, pp.145-150. (In Russ.)]
2. *Атлас. Автономная Республика Крым*. Киев-Симферополь, 2003, 76 с. [Atlas. Autonomous Republic of Crimea. Kyiv-Simferopol, 2003, 76 p. (In Russ.)]
3. Дубас В.В., Алексашкин И.В., Гусев А.Н. *Качественный ИК-спектральный анализ природных силикатов Крыма*. Спектроскопия координационных соединений: тез. докл. XVI Международной конференции (Туапсе, 16-21 сентября 2019 г.). Краснодар: Кубанский гос. ун-т, 2019, с. 102-103. [Dubas V.V., Aleksashkin I.V., Gusev A.N. *Qualitative IR spectral analysis of natural silicates of Crimea*. Spektroskopiya koordinatsionnyh soedinenij: tez. dokl. XVI Mezhdunarodnoj konferencii (Tuapse, 16-21 sentyabrya 2019 g.). Krasnodar: Kubanskij gos. un-t, 2019, pp. 102-103. (In Russ.)]
4. Дубас В.В., Якимова К.В. *Спектральный анализ природных минералов из глинистых отложений Крыма*. Двадцать шестая Всероссийская научная конференция студентов-физиков и молодых ученых (ВНКСФ-26, Уфа, Башкортостан): материалы конференции, тезисы докладов. Т.1. Екатеринбург – Ростов-на-Дону – Уфа: ООО "Альтаир", 2020, с. 199-200. [Dubas V.V., Yakimova K.V. *Spectral analysis of natural minerals from clay deposits of Crimea*. Dvadcat' shestaya Vserossiyskaya nauchnaya konferenciya studentov-fizikov i molodyh uchenykh (VNKSF-26, Ufa, Bashkortostan): materialy konferencii, tezisy dokladov. vol. 1. Ekaterinburg - Rostov-on-Don - Ufa: ООО «Al'tair», 2020, pp.199-200. (In Russ.)]
5. Моисеенко А.С., Егоров И.В. *Инфракрасные спектральные ИИС исследования горных пород. Учебное пособие*. М.: Изд-й центр РГУ нефти и газа, 2013, 194 с. [Moiseenko A.S., Egorov I.V. *Infrared spectral IIS research of rocks. Tutorial*. М.: Izd-j centr RGU nefti i gaza, 1976, 175 p. (In Russ.)]
6. Плюснина И.И. *Инфракрасные спектры минералов*. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1976, 175 с. [Plusnina I.I. *Infrared spectra of minerals*. М.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1976, 175 p. (In Russ.)]
7. Astudillo J.C., M. Bravo C.P. Dumont and M. Thiel. Detached aquaculture buoys in the SE Pacific: Potential dispersal vehicles for associated organisms. *Aquatic Biology*, 2009, vol. 5, no. 3, pp. 219-231.
8. Goldstein M.C., Carson H.S., Eriksen M. Relationship of diversity and habitat area in North Pacific plastic-associated rafting communities. *Marine Biology*, 2014, vol. 161, no. 6, pp. 1441-1453.
9. Gregory M.R. Environmental implications of plastic debris in marine settings- entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, vol. 364, no. 1526, pp. 2013-2025.
10. Thompson J. *Infrared Spectroscopy*. Pan Stanford Publishing, 2018, p. 211.

**SPECTRAL RESEARCHES OF MEAD BLACK-EARTH SOILS OF THE BELOGORSKY DISTRICT,
REPUBLIC OF CRIMEA**

Dubas V.V.¹, Aleksashkin I.V.¹, Mosunov A.A.², Yakimova K.V.²

¹V.I. Vernadsky Crimean Federal University

Acad. Vernadsky aven., 4, Simferopol, 295007, Russia; e-mail: victoriadubas.VD@gmail.com

²Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Abstract. This paper discusses the study of the qualitative characteristics of meadow chernozem soils of the Belogorsky district, Republic of Crimea. Using IR and Raman spectroscopy methods has been reliably established that a qualitative and quantitative change in the component organic-inorganic composition occurs in the analyzed soils. IR spectroscopy revealed differences in the mineralogical composition of soils not only spatially, but also with depth. Among the minerals, primary (calcite, quartz, and gypsum) and secondary (clay) minerals – montmorillonite, kaolinite, halloysite, glauconite, and saponite – are clearly defined. In all samples, the presented minerals form certain associations. The formation of geochemical barriers can only be judged indirectly, based on the results of infrared spectroscopy. Thus, in meadow chernozemic soils formed on clayey rocks, sorption barriers are most likely to form within C (D) horizons, while in soils formed on high carbonate rocks, alkaline barriers are more likely to form. The possibility of the existence of several geochemical barriers within a single soil section should also be taken into account. Qualitative component characteristics also make it possible to predetermine the migration processes of substances not only in solid form, but also in ionic. This is facilitated by an understanding of the processes of coordination of molecules in the analyzed substances and the possibility of attaching accompanying cations and/or anions to them. Using Raman spectroscopy, the presence of polymeric compounds belonging to PVC in soils from the Melnichnoye rural settlement was ascertained for certain. The information obtained suggests a high efficiency of the method in establishing the degree of soil contamination with microplastic.

Key words: meadow chernozem soils, minerals, microplastic, humus, IR spectroscopy, Raman spectroscopy, Belogorsky district.