

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 5, № 3
2020**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 5, № 3
2020**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 5, No. 3, 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, № 3, 2020

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Т.Э. Кулешова, А.И. Желнина, О.Р. Удалова, Г.Г. Панова, Н.Р. Галль**
Динамика конверсии света листьями растений в электрический ток в прикорневой зоне 379
- Р.В. Полозов, Т.И. Грохлина, Л.А. Панченко, В.В. Иванов**
Многомерный статистический анализ пространственных структур ДНК в интерфейсах комплексов гомеодомен-ДНК: «диккерсоновы параметры» 386
- В.И. Лобышев**
О проблеме влияния малых концентраций на биологическую активность 390
- С.Ф. Барановский, Д.Н. Чернышев, М.А. Албет**
Гетероассоциация молекул тиазинового красителя и кофеина в водном растворе 399

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- А.А. Чекушкин, А.С. Лелеков, Р.Г. Геворгиз**
Сезонная динамика предельной продуктивности в горизонтальном фотобиореакторе 405
- М.А. Орлов, Т.Р. Дзелядин, А.А. Сорокин**
Геномный каскад промоторов бактериофага T7: участие вызванной суперспиральностью дестабилизации дуплекса ДНК (SIDD) 412
- С.В. Филиппов, И.В. Лихачёв, В.С. Быстров**
Визуально-дифференциальный анализ структурных перестроек водных кластерных структур, находящихся во внутренней полости D-FF нанотрубок 415
- Л.О. Костюкова, С.В. Леонтьева, Д.П. Воронин, К.А. Рыбакова, А.С. Бучельников, В.В. Костюков**
Фотоиндуцированный перенос заряда в молекуле нильского красного 424
- А.А. Долгов, Е.Н. Богачева, А.Л. Ксенофонтов**
Специфика пространственной структуры белков оболочки потексвирусов 429

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- А.А. Иванова, В.В. Прядун, А.Н. Ефанов, С.А. Яковенко, Е.Ю. Симоненко**
Термодинамические и структурные особенности водно-глицериновых растворов как основного компонента криопротекторных сред для криоконсервации клеток 434

- Г.Т. Маслова, Н.А. Алексеенко, М.Н. Коваленко, А.В. Титова, М.П. Патапович, А.П. Зажогин**
Использование морфоструктурного анализа и атомно-эмиссионной спектроскопии высохших капель плазмы крови для диагностики пациентов с опухолями головного мозга 438
- Т.А. Прокопенко, Н.И. Нечипуренко, И.Д. Пашковская, А.П. Зажогин**
Лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия, морфоструктурный анализ дегидратирующих капель биожидкостей и окислительный стресс у пациентов с хронической ишемией мозга при лазерном облучении крови 444
- Е.И. Венская, Л.М. Лукьяненко, А.С. Скоробогатова**
Влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на состояние липидного бислоя лимфоцитов человека в условиях окислительного стресса *in vitro* 450
- С.М. Панкова, Ф.А. Сакибаев, В.А. Королева, С.С. Ольшанникова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов**
Поиск *in silico* возможных сайтов связывания с носителями при иммобилизации протеолитических ферментов 456
- Н.Л. Меркулова, Е.В. Грехнева, С.В. Чуйкова, В.Н. Малышев**
Хромато-масс-спектрометрическое исследование пептидов кожного секрета безчешуйчатого вида рыб 461
- И.Л. Пластун, А.А. Захаров, А.А. Наумов**
Моделирование межмолекулярного взаимодействия флагеллина и солей металлов в ходе образования наночастиц сульфида серебра методом бактериального синтеза 467
- Т.Г. Щербатюк, А.А. Ляхова, Е.С. Жукова, Т.В. Жилиева, А.С. Пятойкина, И.В. Семенов, А.Л. Цвет, А.Б. Гапеев**
Активность свободнорадикальных процессов у пациентов с первым эпизодом шизофрении 474
- И.А. Черенков, Л.С. Березина, М.Д. Кривилев, В.Г. Сергеев**
Диффузия толуидинового синего в альгинат-желатиновый гидрогель при воздействии пепсина 481
- С.А. Муслев, Л.А. Бабайцева, Ф.К. Хасанов**
О влиянии напитков и питьевой воды на механические свойства зубной эмали 485
- Н.Н. Климович, Г.П. Зубрицкая, Т.И. Козарезова, Е.И. Слободжанина**
Особенности физико-химических свойств мембран эритроцитов при миелодиспластических синдромах у детей 494
- П.В. Нагорнова, А.В. Белкин, В.Н. Дубровский, А.В. Елифанов, А.Д. Шалабодов**
Оценка реологических детерминант крови человека с железодефицитной анемией в сравнении с аналогичными показателями крови здоровых людей 499

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

- Я.В. Трофименко, О.В. Калинин, В.Д. Чиванов, А.Н. Калинин, С.Н. Данильченко**
Исследование влияния рентгеновского излучения на прорастание и синтез пигментов у *Raphanus sativus* 505

С.В. Беспалова, С.М. Романчук, С.В. Чуфицкий

Параметры флуоресценции и динамика роста культуры *Chlorella sorokiniana* при различном содержании биогенных веществ 511

Е.Н. Скуратовская, Ю.В. Дорошенко, А.С. Алёмова, М.А. Ковалева

Биоиндикационная оценка экологического состояния прибрежных акваторий г. Севастополя 517

А.А. Солдатов, И.А. Парфенова

Скелетные мышцы морских рыб и молекулярные системы утилизации кислорода (краткий обзор) 524

А.А. Акшинцев, Г.И. Морозова, М.А. Козлова, Г.М. Баренбойм

Выявление адаптогенного и защитного действия экстрактов из термофильных водорослей на энергетику лейкоцитов в нативной крови по флуоресценции потенциал - чувствительного зонда ДСМ 536

В.А. Лисютин, О.Р. Ластовенко, А.Д. Дегтяр, А.А. Ярошенко, Н.В. Петренко, В.Л. Лучин, К.А. Рыбакова, С.О. Папков

Частотно-временной анализ подводных звуков морских млекопитающих. Усатые киты ...543

К.В. Неверов

Light acclimation of unicellular red alga *Rhodella violacea*: ΔpH build up, antenna reassembling and photoprotection 550

CONTENTS

Volume 5, No. 3, 2020

GENERAL BIOPHYSICS

- T.E. Kuleshova, A.I. Zhelnina, O.R. Udalova, G.G. Panova, N.R. Gall**
Dynamics of light conversion by plants leaves in electricity in a root zone 379
- R.V. Polozov, T.I. Grokhlina, L.A. Panchenko, V.V. Ivanov**
Multivariate statistical analysis of spatial DNA structures at the interfaces of homeodomen-DNA complexes: «Dickerson parameters» 386
- V.I. Lobyshev**
On the problem of low concentrations on biological activity 390
- S.F. Baranovskiy, D.N. Chernyshev, M.A. Albet**
Heteroassociation of thiazine dye molecules and caffeine in aqueous solution 399

MODELLING IN BIOPHYSICS

- A.A. Chekushkin, A.S. Lelekov, R.G. Gevorgiz**
Seasonal dynamics of limit productivity in a horizontal photobioreactor 405
- M.A. Orlov, T.R. Dzhelyadin, A.A. Sorokin**
Genome cascade of T7 bacteriophage: stress-induced duplex destabilization implication (SIDD) 412
- S.V. Filippov, I.V. Likhachev, V.S. Bystrov**
Visual-differential analysis of structural realignations water cluster structures located in the domain of the D-FF nanotubes 415
- L.O. Kostyukova, S.V. Leontyeva, D.P. Voronin, K.A. Rybakova, A.S. Buchelnikov, V.V. Kostyukov**
Photo-induced charge transfer in the nile red molecule 424
- A.A. Dolgov, E.N. Bogacheva, A.L. Ksenofontov**
Pecularity of the potexvirus coat spatial structure 429

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- A.A. Ivanova, V.V. Pryadun, A.N. Yefanov, S.A. Yakovenko, E.U. Simonenko**
Thermodynamic and structural features of water-glycerol solutions as the main component of cryoprotective media for cryopreservation of cells 434

- G.T. Maslova, N.A. Alekseenko, M.N. Kovalenko, A.V. Titova, M.P. Patapovich, A.P. Zajogin**
Using morphostructure analysis and atomic emission spectrometry of dried blood plasma droplets for the diagnosis of patients with brain tumors 438
- T.A. Prokopenko, N.I. Nechipurenko, I.D. Pashkovskaya, A.P. Zajogin**
Laser atomic emission spectrometry, morphostructural analysis of dehydrating drops of biosfluids and oxidative stress in patients with chronic brain ischemia in the treatment of laser irradiation 444
- E. Venskaia, L. Lukyanenko, A. Skarabaha**
The effect of amyloid fibrils from lysozyme on the lipid bilayer of human lymphocytes under the conditions of oxidative stress *in vitro* 450
- S.M. Pankova, F.A. Sakibaev, V.A. Koroleva, S.S. Olshannikova, M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov**
Search *in silico* of possible link sites with carrier at immobilization of proteolytic enzymes 456
- N.L. Merkulova, E.V. Grekhnyova, S.V. Chuikova, V.N. Malyshev**
Chromato-mass-spectrometric study of skin slime peptides of fish without scales 461
- I.L. Plastun, A.A. Zakharov, A.A. Naumov**
Modeling of flagellin and metal salts intermolecular interaction during the silver sulfide nanoparticles formation by bacterial synthesis 467
- T.G. Shcherbatyuk, A.A. Lyakhova, E.S. Zhukova, T.V. Zhilyaeva, A.S. Pyatyakina, I.V. Semennov, A.B. Gapeyev**
Activity of free radical processes in patients with first episode of schizophrenia 474
- I.A. Cherenkov, L.S. Berezina, M.D. Krivilyov, V.G. Sergeyev**
Diffusion of toluidine blue in alginate-gelatin hydrogel under the influence of pepsin 481
- S.A. Muslov, L.A. Babaitseva, F.K. Khasanov**
Influence of milk and dairy products on the hardness and roughness of teeth enamel 485
- N.N. Klimkovich, G.P. Zubritskaya, T.I. Kozarezova, E.I. Slobozhanina**
Features of the physico-chemical properties of erythrocyte membranes in myelodysplastic syndromes children 494
- P.V. Nagornova, A.V. Belkin, V.N. Dubrovsky, A.V. Elifanov, A.D. Shalabodov**
Evaluation of the rheological determinants of human blood with iron deficiency anemia in comparison with similar blood parameters of healthy people 499

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

- Ya.V. Trofimenko, O.V. Kalinkevich, V.D. Chivanov, A.N. Kalinkevich, S.N. Danilchenko**
The influence of x-ray irradiation on germination and synthesis of pigments in *Raphanus sativus* 505
- S.V. Bespalova, S.M. Romanchuk, S.V. Chufitskiy**
Fluorescence parameters and *Chlorella sorokiniana* culture growth dynamics at different content of biogenic substances 511

E.N. Skuratovskaya, Yu.V. Doroshenko, A.S. Alyomova, M.A. Kovaleva

Bioindication assessment of the ecological state of Sevastopol coastal waters 517

A.A. Soldatov, I.A. Parfenova

Skeletal muscles of marine fish and molecular oxygen utilization systems (brief overview) 524

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

Detection of adaptogenic and protective of thermophilic algae extracts effects on leukocyte energy status in native blood using a potential-sensitive fluorescent probe DSM 536

V.A. Lisyutin, O.R. Lastovenko, A.D. Degtyar, A.A. Yaroshenko, N.V. Petrenko,

V.L. Luchin, K.A. Rybakova, S.O. Papkov

Frequency-time analysis of underwater sounds of marine mammals. Baleen whale 543

K.V. Neverov

Light acclimation of unicellular red alga *Rhodella violacea*: Δ pH build up, antenna reassembling and photoprotection 550

ДИНАМИКА КОНВЕРСИИ СВЕТА ЛИСТЬЯМИ РАСТЕНИЙ В ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ТОК В ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЕ

Кулешова Т.Э.^{1,2}, Желнина А.И.¹, Удалова О.Р.², Панова Г.Г.², Галль Н.Р.¹

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН

ул. Политехническая, 26, г. Санкт-Петербург, 194021, РФ; e-mail: www.piter.ru@bk.ru

² Агрофизический научно-исследовательский институт

пр-т Гражданский, 14, г. Санкт-Петербург, 195220, РФ; e-mail: gaiane@inbox.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. В работе рассматривается взаимосвязь светопоглощательной способности листьев растений и генерируемых в прикорневой зоне биоэлектрических потенциалов. Для измерения физических параметров состояния растительного организма *in vivo* в процессе развития – динамики поглощения света листьями и электрических биопотенциалов в ризосфере, а также автоматического мониторинга параметров окружающей среды, создана экспериментальная установка на основе неинвазивных датчиков. С помощью разработанного многофункционального метода фитомониторинга измерены корреляция изменений температуры и влажности воздуха, увлажненности корнеобитаемой среды с электрическими свойствами корневой системы и преобразованием световой энергии в условиях искусственного освещения. Получено, что значения биоэлектрических потенциалов (БЭП) варьируют в пределах 40-120 мВ для хлорофитума в течение 1-30 дней его развития и 50-250 мВ для салата на 20-33 сутки вегетационного периода, а величины коэффициентов поглощения меняются от 0,6 до 0,8 для салата и 0,6-0,7 для хлорофитума. Рассчитанные значения эффективности световой конверсии, которая определяется как отношение генерируемой электрической энергии в прикорневой зоне к потребленной растением мощности световой энергии, составили 0,8 ррб для салата, 0,4 ррб для хлорофитума. Полученные результаты могут быть применены для совершенствования технологии получения экологически чистой зеленой энергии, базирующейся на преобразовании энергии света в электричество с помощью растительно-микробных топливных элементов.

Ключевые слова: биоэлектрический потенциал, поглощение света, неинвазивное измерение, датчики, Arduino.

Процессы поглощения света и питательных веществ взаимосвязаны. С одной стороны, растения влияют на свойства, направленность и интенсивность процессов трансформации соединений в прикорневой зоне, выделяя более 20 % ассимилированного в ходе фотосинтеза углерода. Их экссудаты включают в себя сахара, аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды, флаваноны, фенольные соединения и ферменты [1]. В свою очередь выделяемые ризодепозиты влияют на pH почвы, транспорт воды, доступность кислорода, и могут использоваться в жизнедеятельности микроорганизмов [2]. С другой стороны, состояние ризосферы – водный режим, транспорт ионов, оказывают действие на транспирацию и оптические свойства листовой поверхности [3]. Кроме того, метаболические реакции, протекающие в ходе поглощения корневой системой питательных элементов, способствуют созданию электрического градиента потенциалов в корнеобитаемой среде.

Впервые способность живых организмов к биоэлектрoгенезу была показана Л. Гальвани в конце 18 века. Считается, что возникновение электрических потенциалов связано с наличием в клетках избирательно проницаемых для ионов мембранных структур [4]. Различия в концентрациях ионов (K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , NO_3^- , $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-} и др.) внутри и снаружи клеток является причиной возникновения трансмембранного потенциала [5]. Наличие вариации биопотенциалов в прикорневой зоне являются следствием метаболических процессов – в первую очередь, поглощения питательных веществ и транспорта ионов. Также в самой почве и корнеобитаемой среде отдельно существуют электрические поля, связанные с диффузионной электродвижущей силой (ЭДС), мембранными ЭДС, диффузионно-адсорбционными потенциалами в водонасыщенных средах и т.д. [6]. Обменная адсорбция веществ в системе корнеобитаемая среда-растение – ионов H^+ на катионы; анионов HCO_3^- , OH^- и органических кислот на минеральные анионы [7], приводит к возникновению разности потенциалов вдоль корневой системы. При этом сами корни выступают в качестве ЭДС, наряду с окислительно-восстановительными реакциями в ризосфере.

По всей вероятности, величина генерируемого в прикорневой зоне электрического тока должна определяться степенью конверсии света – главного поставщика энергии для растительного организма.

Изучение механизмов биоэлектрoгенеза является актуальной задачей как с фундаментальной точки зрения – природа возникновения биоэлектрических потенциалов (БЭП) в настоящее время до конца не определена, так и для прикладных исследований – необходимость совершенствования систем фитомониторинга [8] и растительно-микробных топливных элементов [9, 10].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании динамики поглощения света листьями растений и одновременной генерации в прикорневой зоне биоэлектрических потенциалов.

В качестве объектов для исследования были выбраны модельное растение – хлорофитум хохлатый (*Chlorophytum comosum* (Thunb.) Jacques) и сельскохозяйственнозначимая культура – салат (*Lactuca sativa* L.)

сорта Азарт. Листья хлорофитума и салата являются удобным объектом для изучения светопоглощательных свойств, так как имеют большую поверхность, кроме того, усвоенная салатом энергия света тесно связана с продуктивностью растительной культуры. Также, оба объекта достаточно быстро растут и имеют развитую, густую корневую систему, что позволяет изучать стабильно генерируемые в прикорневой зоне биоэлектрические потенциалы уже на ранних стадиях развития.

Растения выращивали в лабораторном фитотроне в условиях искусственного освещения. Источниками света служили светодиодные лампы (Navigator, Китай), излучающие теплый белый свет. Продолжительность светового периода составляла 12 часов в сутки. В качестве корнеобитаемой среды был взят универсальный готовый питательный грунт Terra Vita (Россия), содержащий не менее 150 мг/мл азота (NH_4+NO_3), 270 мг/мл фосфора (P_2O_5), 300 мг/мл калия (K_2O).

Контроль параметров окружающей среды – температуры, влажности, освещенности, а также состояния растительного организма осуществлялся с помощью системы неинвазивных датчиков и микроконтроллера. Все параметры регистрировались автоматически каждые 15 минут в процессе развития растений. Общий вид измерительной системы представлен на рисунке 1. Установка включает в себя: 1) емкость для выращивания, заполненную почвогрунтом, и объект исследования (позиция 1); 2) систему электродов с выводами из емкости, выполненную из коррозионностойкого материала и содержащую отверстия для прорастания корней и обеспечения тем самым поверхностного электрического контакта (позиция 2); 3) цифровой 16-битный датчик GY-302 на чипе BH1750, содержащий фотодиод, чувствительный к видимому свету и практически не подверженный влиянию инфракрасного излучения, для измерения освещенности с точностью ± 1 Лк (позиция 3); 4) датчик DHT11, состоящий из термистора и емкостного датчика влажности, с диапазоном измерения температуры от 0°C до 50°C с точностью $\pm 2^\circ\text{C}$, диапазоном измерения влажности от 20 до 80% с точностью 5% (позиция 4); 5) аппаратную платформу Arduino Uno, построенную на микроконтроллере ATmega328, с разрешением аналоговых входов 10 бит (позиция 5) и соединительные провода. Датчик освещенности BH1750 имеет следующие выводы: VCC (питание), GND (земля), SCL (линия тактирования), SDA (линия данных), которые подключаются к источнику напряжения 5В, выводу заземления, аналоговым входам A4 и A5 на Arduino, соответственно. Датчик температуры и влажности DHT11 содержит выводы VCC (питание), GND (земля), DATA (вывод данных), которые подключаются к источнику напряжения 5В, выводу заземления, цифровому входу pin 2 на Arduino, соответственно.

Биоэлектрические потенциалы прикорневой зоны регистрировались с помощью разработанного нами неинвазивного метода [11]. Измерение биоэлектрических потенциалов, в зависимости от подключаемой нагрузки, связано с передачей доли энергии от исследуемого объекта к измерительному прибору. Высокое входное сопротивление аппаратной платформы (10^5 Ом) позволяют проводить измерения в режиме, который в минимальной степени отбирает ток от тестируемого объекта и изменяет его физиологическое состояние. В соответствии с полярностью электроды подключались к аналоговому входу A0 и выводу заземления GND на

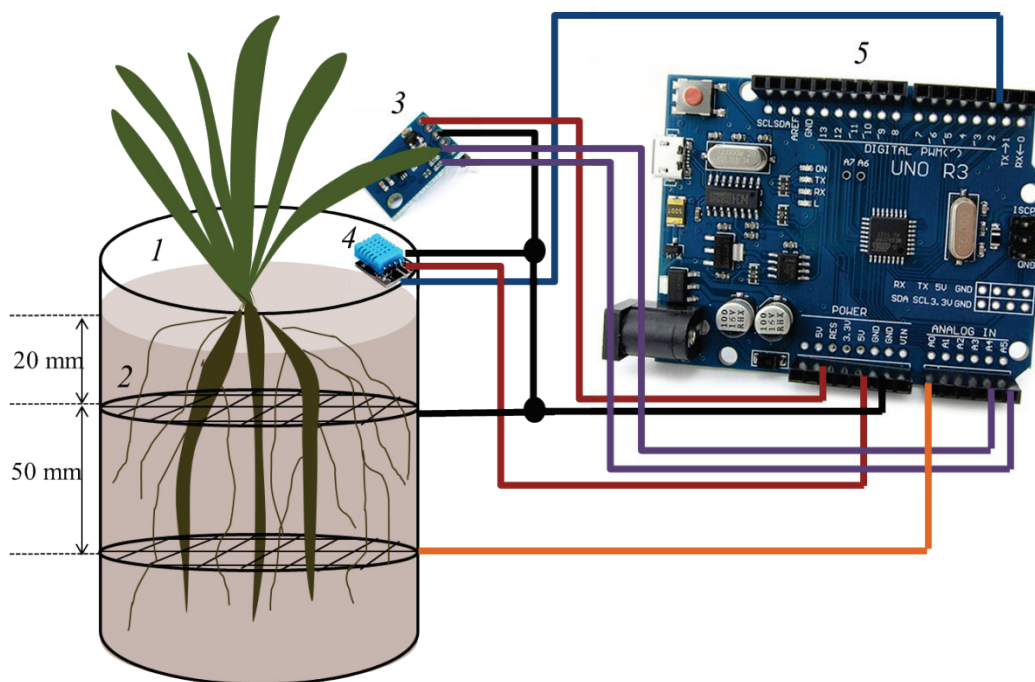


Рисунок 1. Схематичное изображение экспериментальной установки, включающей: 1 – исследуемый образец в емкости для выращивания, заполненной почвогрунтом, 2 – систему электродов для измерения биопотенциалов прикорневой зоны, 3 – датчик освещенности, 4 – датчик температуры и влажности, 5 – аппаратную платформу

Arduino. В большинстве случаев корневая шейка заряжена электроотрицательно по отношению к кончикам корней, то есть верхний электрод отрицательный, а нижний положительный.

Для измерения доли поглощенной энергии света листьями исследуемых растений *in vivo* использован датчик освещенности BH1750. Датчик размещается под листовой поверхностью в фиксированном положении и позволяет измерять динамику пропускания света сквозь исследуемый объект. Тогда коэффициент поглощения света A листьями может быть рассчитан по формуле:

$$A = \frac{k \cdot \Phi - \Phi_T}{\Phi}, \quad (1)$$

где k – коэффициент, учитывающий отражение от листа; Φ (лм) – интенсивность светового потока, приходящего на лист; Φ_T (лм) – интенсивность прошедшего сквозь лист света, автоматически регистрируемая каждые 15 минут с помощью фотодиода. В данной работе сделаем некоторое приближение и предположим, что количество отраженного света в видимом диапазоне остается практически постоянным для рассматриваемого периода развития растений. Опираясь на проведенное ранее исследование [12], будем считать, что коэффициент отражения равен 0,2.

В результате изучения динамики конверсии света листьями салата в биоэлектрические потенциалы в прикорневой зоне получены следующие результаты. Средняя температура окружающей среды составила 24 °С, причем в условиях светового дня величина температуры была 25±3 °С, а при темновом режиме опускалась до 22±1 °С (рис. 2а). Влажность воздуха изменяли от 10% до 60%. Средняя величина влажности составила 36%. Для светового и темнового режима наблюдалось уменьшение и увеличение содержания водяного пара в атмосферном воздухе (рис. 2б), обратное изменениям температуры.

Изменения параметров окружающей среды, связанные со сменой дня и ночи, играют важную роль в жизнедеятельности растений. В частности, они влияют на интенсивность транспирации, которая в свою очередь оказывает действие на градиент электрических потенциалов в корнеобитаемой среде. Связь между амплитудой колебаний интенсивности транспирации, скоростью жидкости в транспортной системе растения и уровнем освещенности была показана в [13]. Нами выявлено, что при включении света наблюдается плавный рост БЭП (~ на 10%) до середины светового дня и затем плавное падение до начальной величины [14]. Такая циклическая динамика биопотенциалов, видимо, является следствием поглощения воды и движения минеральных веществ вместе с водным потоком.

Сравнение динамики пропускания света листовой пластиной растения салата и значений БЭП в прикорневой зоне показало некоторую корреляцию этих величин (рис. 3а). При развитии растения, листовая пластина становится более оптически плотной, при этом величина проходящего сквозь лист светового потока постепенно уменьшается. На стадии, соответствующей технической спелости зеленой массы (30-32 день эксперимента), регистрируемая датчиком освещенность под листом растениям снижается в ~3 раза, в то время как БЭП увеличивается в ~2,5 раза. Рост биопотенциала по большей части является следствием увлажнения почвогрунта и уменьшения за счет этого электрического сопротивления корнеобитаемой среды. При этом

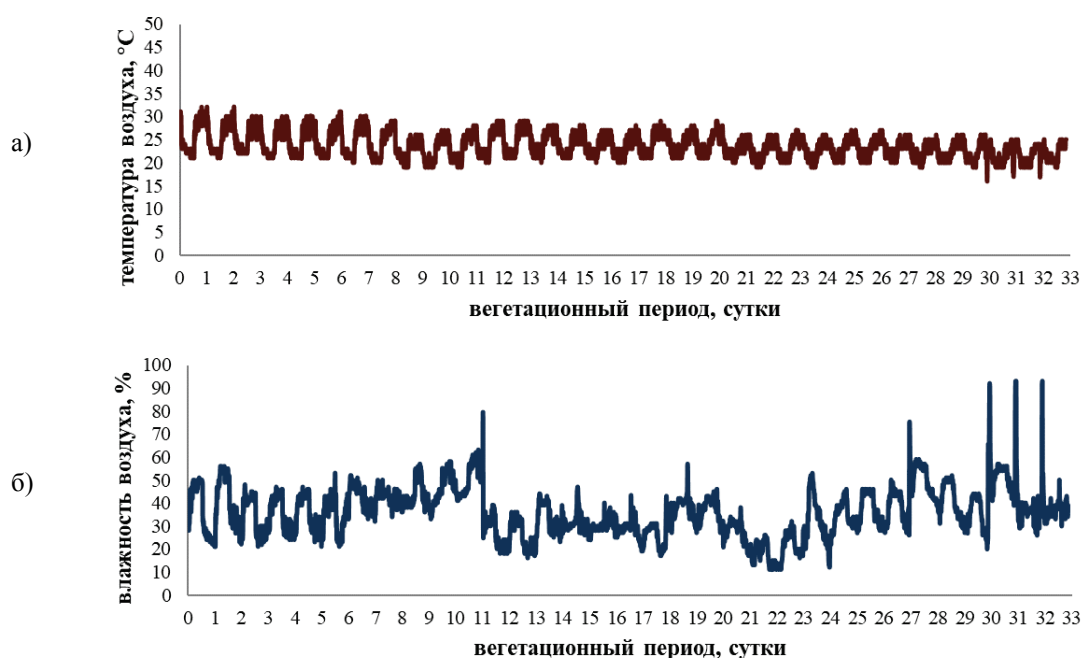


Рисунок 2. Параметры окружающей среды при культивировании салата: суточная динамика температуры воздуха (а) и влажности воздуха (б)

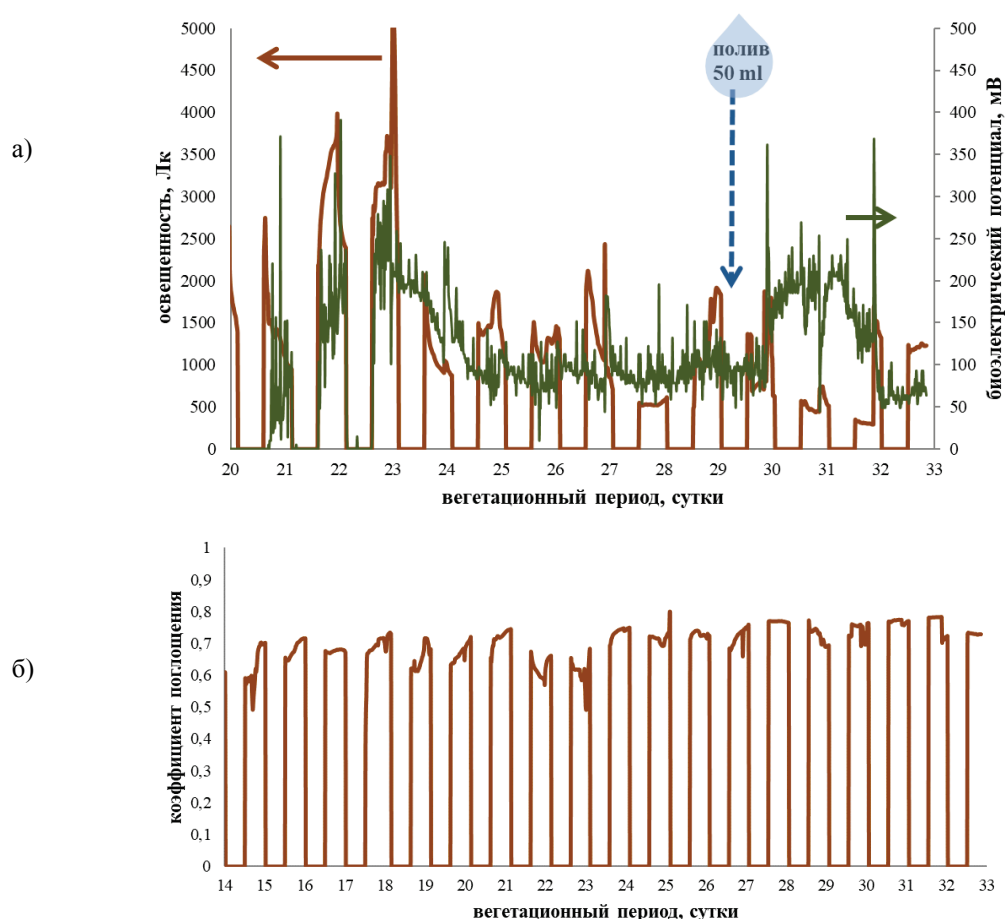


Рисунок 3. Динамики пропускания света листовой поверхностью салата и биоэлектрических потенциалов в прикорневой зоне (а) и изменение коэффициента поглощения в процессе развития салата (б)

наблюдаемый скачок до 350 мВ, видимо, отражает, некоторое физиологическое состояние из-за перепада водного потенциала – изменение гидростатического давления в корнеобитаемой среде при том же корневом давлении.

На рисунке 3б отображены рассчитанные по формуле 1 коэффициенты поглощения, варьируемые от 0,6 до 0,8 в процессе развития салата. В большинстве случаев можно отметить некоторое увеличение поглощения ~ на 3% в течение светового дня.

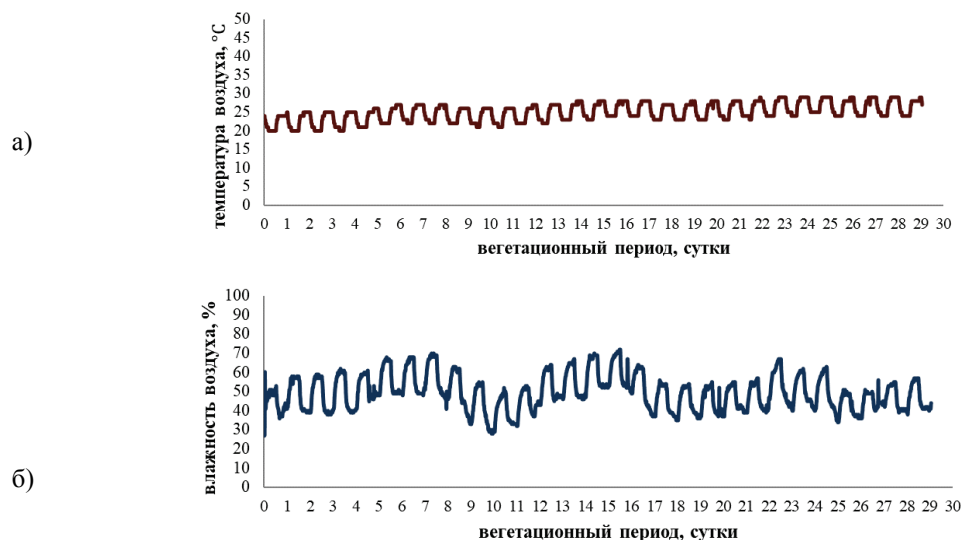


Рисунок 4. Параметры окружающей среды при выращивании хлорофитума: суточная динамика температуры воздуха (а) и влажности воздуха (б)

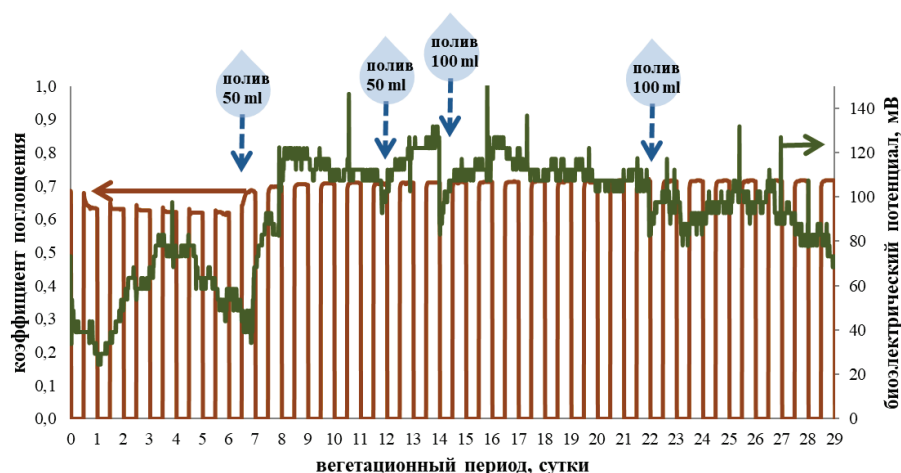


Рисунок 5. Динамики поглощения света листовой поверхностью хлорофитума и биоэлектрических потенциалов в прикорневой зоне

При изучении динамики конверсии света листьями хлорофитума в биоэлектрические потенциалы в прикорневой зоне получены схожие результаты. Температура и влажность также варьируют в пределах 20-28 °C и 30-70 %, соответственно, в зависимости от светового режима и водного режима растения (рис. 4).

На рисунке 5 представлено сравнение динамики поглощения света листьями хлорофитума и генерируемых в прикорневой зоне биоэлектрических потенциалов. Хотя листья хлорофитума более оптически плотные, тем не менее величина коэффициента поглощения света лежит в том же диапазоне – 0,6-0,7, что и для растений салата. Однако наблюдается меньшее изменение в процессе развития, что, по-видимому, связано с тем, что хлорофитум многолетнее растение, имеет большую продолжительность жизни и более медленную скорость роста листовой пластины.

Рост светопоглощательной способности листьев хлорофитума наблюдается на 7 день развития и коррелирует с увеличением биопотенциала, вызванным также увлажнением почвогрунта.

Проведем примерный расчет эффективности световой конверсии K , определяемой как отношение генерируемой электрической энергии в прикорневой зоне к потребленной растением мощности световой энергии:

$$K = \frac{P_{\text{ризосфера}}}{P_{\text{свет}}}, \quad (2)$$

где $P_{\text{ризосфера}}$ (Вт) – выработанная мощность электроэнергии в ризосферной среде, $P_{\text{свет}}$ (Вт) – поток излучения, поглощенный листом растения. Так как напрямую мы эти величины не регистрируем, необходимо сделать некоторые приближения и перевести экспериментально полученные значения пропускания света листовой поверхностью (измеренные в единицах освещенности) и электрические свойства прикорневой зоны (измеренные как разность потенциалов) в энергетические единицы мощности.

На основе полученных коэффициентов поглощения света листьями A и измеренной величины освещенности E (лк), приходящей на растение, а также с учетом площади листовой поверхности растения S (м²), световой эффективности источника света η (лм/Вт), величину $P_{\text{свет}}$ можно рассчитать, как:

$$P_{\text{свет}} = \frac{S \cdot A \cdot E}{\eta}, \quad (3)$$

Вырабатываемая в ризосферной зоне мощность рассчитывается по формуле:

$$P_{\text{ризосфера}} = I \cdot U, \quad (4)$$

где I (А) – электрический ток в корнеобитаемой среде, U (В) – величина биоэлектрического потенциала.

Тогда средняя величина эффективности световой конверсии составит для салата $0,8 \cdot 10^{-9}$ или 0,8 ppb, для хлорофитума $400 \cdot 10^{-9}$ или 0,4 ppm.

Таким образом, с помощью созданного многофункционального метода фитомониторинга получено, что БЭП варьируют в пределах 40-120 мВ для хлорофитума в течение 1-30 дней его развития и 50-250 мВ для салата на 20-33 сутки вегетационного периода, а величины коэффициентов поглощения меняются от 0,6 до 0,8 для салата и 0,6-0,7 для хлорофитума. Экспериментально полученные зависимости позволяют сделать вывод о связи процессов поглощения энергии света листьями и генерации биоэлектрических потенциалов в ризосфере. Данный эффект может быть использован для повышения эффективности растительно-микробного топливного элемента за счет увеличения светопоглощательных свойств листьев. Низкая эффективность конверсии световой энергии в

электрическую в ризосферной зоне рассчитанная на данном этапе – 0,8 ppb для салата, 0,4 ppm для хлорофитума, лишь указывает на возможности и пути увеличения этого значения для дальнейшего использования при получении экологически чистой энергии.

Список литературы / References:

1. Azri Y.M., Tou I., Sadi M., Benhabyles L. Bioelectricity generation from three ornamental plants: Chlorophytum comosum, Chasmanthe floribunda and Papyrus diffusus. *International Journal of Green Energy*, 2018, vol. 15, no. 4. DOI: 10.1080/15435075.2018.1432487.
2. Tou I., Azri Y.M., Sadi M., Lounici H., Kebbouche-Gana S. Chlorophytum microbial fuel cell characterization. *International Journal of Green Energy*, 2019, vol. 16, no. 12. DOI: 10.1080/15435075.2019.1650049.
3. Ильницкий О.А., Радченко С.С., Лискер И.С., Палий И.Н., Радченко Н.С. Оптические свойства листьев растений в ближнем инфракрасном излучении в связи с их водным режимом. *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*, 2007, № 94. [Il'nitsky O.A., Radchenko S.S., Lisker I.S., Paly I.N., Radchenko N.S. The optical properties of plant leaves in near infrared radiation in connection with their water regime. *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Garden*, 2007, no. 94. (In Russ.)]
4. Опритов В.А., Пятюгин С.С., Ретивин В.Г. *Биоэлектрогенез у высших растений*. М.: Наука, 1991, 216 с. [Opritov V.A., Pyatygin S.S., Retivin V.G. *Bioelectrogenesis in higher plants*. M.: Nauka, 1991, 216 p. (In Russ.)]
5. Опритов В.А. Электричество в жизни животных и растений. *Соросовский образовательный журнал*, 1996, no. 9. [Opritov V.A. Electricity in the life of animals and plants. *Soros Educational Journal*, 1996, no. 9. (In Russ.)]
6. Поздняков А.И., Позднякова Л.А., Позднякова А.Д. *Стационарные электрические поля в почвах*. М: KMK Scientific Press Ltd, 1996, 358 с. [Pozdnyakov A.I., Pozdnyakova L.A., Pozdnyakova A.D. *Stationary electric fields in soils*. M: KMK Scientific Press Ltd, 1996, 358 p. (In Russ.)]
7. Медведев С.С. *Физиология растений: учебник*. СПб.: БХВ-Петербург, 2012, 512 с. [Medvedev S.S. *Plant Physiology: A Textbook*. SPb: BHV-Petersburg, 2012, 512 p. (In Russ.)]
8. Hasegawa Y., Hoshino R., Uchida H. Development of cultivation environment control system using plant bioelectric potential. *Proceedings of NOLTA*, 2015.
9. Strik D.P., Hamelers H.V.M., Snel J.F., Buisman C.J. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *International Journal of Energy Research*, 2008, vol. 32, no. 9. DOI: 10.1002/er.1397.
10. Chiranjeevi P., Yeruva D. K., Kumar A. K., Mohan S. V., Varjani S. Plant-Microbial Fuel Cell Technology. *Microbial Electrochemical Technology*. Elsevier, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-444-64052-9.00022-4.
11. Кулешова Т.Э., Бушлякова А.В., Галль Н.Р. Неинвазивное измерение биоэлектрических потенциалов растений. *Письма в ЖТФ*, 2019, т. 45, № 5. [Kuleshova T.E., Bushlyakova A.V., Gall N.R. Noninvasive measurement of bioelectric potentials of plants. *Technical Physics Letters*, vol. 45, no. 3. DOI: 10.1134/S1063785019030106. (In Russ.)]
12. Кулешова Т.Э., Черноусов И.Н., Удалова О.Р., Аникина Л.М., Хомяков Ю.В., Александров А.В., Середин И.С., Фефанов С.В., Щеглов С.А., Галль Н.Р., Панова Г.Г. Влияние спектральных особенностей световой среды на поглощение света листьями салата и его нетто-продуктивность. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 1. DOI: 10.31857/S0006302920010147. [Kuleshova T.E., Chernousov I.N., Udaloval O.R., Anikina L.M., Khomyakov Yu.V., Aleksandrov A.V., Seredin I.S., Feofanov S.V., Shcheglov S.A., Gall N.R., Panova G.G. The influence of the spectral properties of the lighting environment on light absorption by lettuce leaves and the net productivity of lettuce. *Biofizika*, 2020, vol. 65, no. 1. DOI: 10.1134/S0006350920010121. (In Russ.)]
13. Мелешенко С.Н., Карманов В.Г. Математическая модель водного обмена растения с учетом механизма положительной обратной связи. *Биофизика*, 1966, т. 11, № 3. [Meleschenko S.N., Karmanov V.G. A mathematical model of water metabolism of a plant, taking into account the mechanism of positive feedback. *Biophysics*, 1966, vol. 11, no. 3. (In Russ.)]
14. Кулешова Т.Э., Шеина И.Ю., Черноусов И.Н., Удалова О.Р., Блохин Ю.И., Александров А.В., Жестков А.С., Панова Г.Г., Галль Н.Р. Комплекс неинвазивных измерений оптических свойства листьев и биопотенциалов растений для фитомониторинга. *Материалы II Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего», посвященной памяти академика Е.И. Ермакова*. СПб.: ФГБНУ АФИ, 2019. [Kuleshova T.E., Sheina I.Yu., Chernousov I.N., Udaloval O.R., Blokhin Yu.I., Aleksandrov A.V., Zhestkov A.S., Panova G.G., Gall N. R. A complex of non-invasive measurements of the optical properties of leaves and plant biopotentials for phytomonitoring. *Materials of the II International Scientific Conference "Trends in the Development of Agrophysics: from Actual Problems of Agriculture and Plant Growing to Future Technologies"*, dedicated to the memory of Academician E.I. Ermakova. SPb.: FGBNU AFI, 2019. (In Russ.)]

DYNAMICS OF LIGHT CONVERSION BY PLANTS LEAVES IN ELECTRICITY IN A ROOT ZONE

Kuleshova T.E.^{1,2}, Zhelnina A.I.¹, Udalova O.R.², Panova G.G.², Gall N.R.¹¹ Ioffe InstitutePolytechnical str., 26, St. Petersburg, 194021, Russia; e-mail: www.piter.ru@bk.ru² Agrophysical Research InstituteGrazhdansky pr., 14, St. Petersburg, 195220, Russia; e-mail: gaiane@inbox.ru

Abstract. The work is devoted to the interrelation of the light absorption by plant leaves and bioelectric potentials generated in the rhizosphere. The experimental setup based on non-invasive sensors has been made to measure *in vivo* the physical parameters of the plant state in the process of development – the dynamics of light absorption by leaves and biopotentials in the rhizosphere, as well as automatic monitoring of environmental parameters. The correlation of temperature and air humidity, humidity of the root habitat changes with the electrical properties of the root system and the conversion of light energy under artificial lighting were measured using the developed multifunctional method of phytomonitoring. It was registered that values of bioelectric potentials (BEP) vary within 40-120 mV for chlorophytum during 1-30 days of its development and 50-250 mV for lettuce on days 20-33 of the growing season, and the absorption coefficients vary from 0.6 up to 0.8 for salad and 0.6-0.7 for chlorophytum. The calculated values of the light conversion efficiency, which is defined as the ratio of the generated electric energy in the root zone to the light energy consumed by the plant, were 0.8 ppb for lettuce, 0.4 ppm for chlorophytum. The results can be applied to improve the technology for environmentally friendly green energy, based on the conversion of light energy into electricity - plant-microbial fuel cells.

Key words: *bioelectric potential, light absorption, non-invasive measurement, sensors, Arduino.*

МНОГОМЕРНЫЙ СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР ДНК В ИНТЕРФЕЙСАХ КОМПЛЕКСОВ ГОМЕОДОМЕН-ДНК: «ДИККЕРСОНОВЫ ПАРАМЕТРЫ»

Полозов Р.В.¹, Грохлина Т.И.², Панченко Л.А.³, Иванов В.В.^{4,5}

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: polrob@mail.ru

² Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН

г. Пущино, 142290, РФ

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

г. Москва, РФ

⁴ Объединенный институт ядерных исследований

г. Дубна, РФ

⁵ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

г. Москва, РФ

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. Специфические комплексы гомеодоменов с ДНК образуются при связывании белка с двуспиральной ДНК в В-форме (по широкому желобу). Классификация комплексов белок-ДНК и их интерфейсов по физико-химическим, геометрическим параметрам связана с решением ряда задач вычислительного и статистического характера. Классификация должна дать сведения о взаимосвязи комплексов друг с другом, дать возможность проследить их эволюцию и дать основу для формулировок правил узнавания и построения моделей узнавания. Для решения задач классификации необходимо составить список надлежащих дескрипторов комплексов и их интерфейсов, провести многомерный статистический анализ данных из этого списка. Мы используем геометрические параметры, 3DNA: a software package, пространственных структур ДНК в интерфейсах 75 комплексов гомеодомен-ДНК (PDB). В данной работе представлены результаты многомерного статистического анализа «диккерсоновых параметров» пар азотистых оснований ДНК в интерфейсах комплексов гомеодомен-ДНК.

Ключевые слова: гомеодомен-ДНК, «диккерсоновы параметры», интерфейс, деформация ДНК, классификация.

Процессы ассоциации и диссоциации белков – факторов транскрипции с ДНК – являются основой регуляции транскрипции. Структурные типы факторов транскрипции и их комплексов с ДНК весьма разнообразны и образуют несколько семейств. Одно из них – это семейство гомеодоменов и их комплексов с ДНК. Гомеодомены регулируют дифференцировку клеток. Это обширное семейство организовано весьма просто – относительно небольшой участок ДНК (до 20 пар азотистых оснований) формирует достаточно плотную упаковку с атомными группами α -спирали гомеодомена («узнающая спираль»). И эта же упаковка дает основу для формирования нужной, вполне определенной ориентации атомов ДНК и белка, и образование специфических атомных контактов в том числе через молекулу воды. В этой области тесного соприкосновения белка и ДНК («интерфейс») молекула ДНК деформируется: искажается как «внутренняя геометрия» нуклеотидов, так и форма двойной спирали ДНК (геликоид). Степень деформации зависит от нуклеотидной последовательности ДНК в области интерфейса и уникальна для каждого из комплексов гомеодомен-ДНК. Совокупность всех этих факторов и параметров узнавания обеспечивает надежность, гибкость, точность и характерные времена узнавания. Эти специфические контакты могут давать независимый вклад в аффинность и специфичность. Но это не всегда имеет место, поэтому в некоторых интерфейсах необходимо принимать во внимание зависимость положения контактов в интерфейсах относительно соседних атомных групп белка и ДНК. Мы представили лишь схему образования интерфейсов комплексов гомеодомен-ДНК. Более конкретное и подробное изложение проблемы узнавания белками ДНК (не только факторами транскрипции) приведено в обзоре [1], в котором дан большой список цитированных работ и приведены соответствующие доводы и доказательства.

Анализ пространственной структуры интерфейсов комплексов гомеодомен-ДНК основан на геометрических характеристиках ДНК, полученных с использованием пакета 3DNA, предназначенного для анализа, реконструкции и визуализации трехмерных структур нуклеиновых кислот [2]. В данной работе мы анализируем следующие группы:

1. Параметры, описывающие отклонения положения оснований в паре от идеального их положения – Shear, Stretch, Stagger, Buckle, Propeller, Opening («диккерсоновы параметры»). Здесь Shear и Stretch определяют смещения оснований в плоскости пары, Opening – угол между основаниями в плоскости пары. Три оставшихся параметра характеризуют выход оснований из плоскости. «Идеальным» здесь является положение оснований в абсолютно плоской паре, где все шесть параметров равны [3].

2. Параметры, описывающие пространственное расположение соседних пар оснований, т.е. положение и ориентацию одной пары относительно другой: сдвиги Shift, Slide и Rise по осям Ox, Oy, Oz соответственно и три поворота Tilt, Roll и Twist (параметры твердого тела).

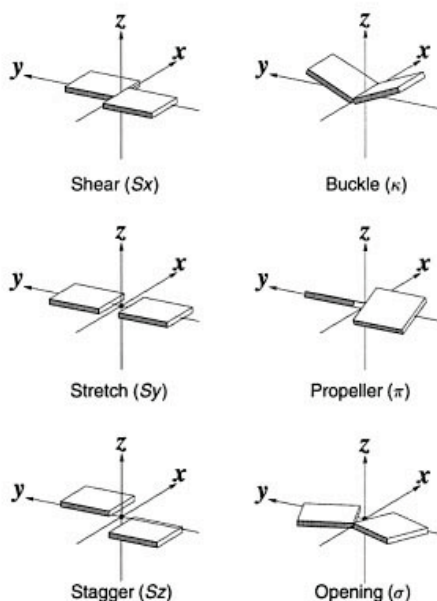


Рисунок 1. «Диккерсоновы параметры»

3. Параметры, описывающие регулярность спирали (спиральные параметры), - смещения по осям x , y и z - displacement, y -displacement, helical rise соответственно, и повороты вокруг осей спирали - inclination (η), tip (θ) и helical twist (Ωh). Две последние группы описывают взаимное положение соседних пар оснований в разных системах координат - в системе отсчета, связанной с димером, и локальной системе спирали. Мы не приводим здесь подробное толкование этих параметров и систем отсчета, т.к. это относится к алгоритму программы и приведено авторами в [2].

4. Кроме того, еще одна группа параметров - это параметры Shift, Slide и Rise по осям Ox , Oy , Oz , соответственно, и три поворота Tilt, Roll и Twist, аналогичные группе два, с тем отличием, что они характеризуют положение соседних оснований в цепочке.

Для анализа мы использовали численные значения «диккерсоновых параметров» пар азотистых оснований (Shear, Stretch, Stagger, Buckle, Propeller, Opening, см. рис. 1) для каждого участка нуклеотидной последовательности ДНК в 75 интерфейсах комплексов гомеодомен-ДНК.

Для выявления влияния качественного фактора - нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК в интерфейсе гомеодомен-ДНК, на «диккерсоновы параметры» мы использовали однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA, и непараметрические критерии - Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis test) и медианный критерий Брауна-Муда (Brown-Mood test). Результаты анализа позволяют сделать вывод о том, что влияние нуклеотидной последовательности на переменные Stretch, Stagger, Buckle, Propeller, Opening статистически значимо на уровне $\alpha=0,05$, а на переменную Shear - статистически не значимо. Отметим, что результаты, полученные с помощью

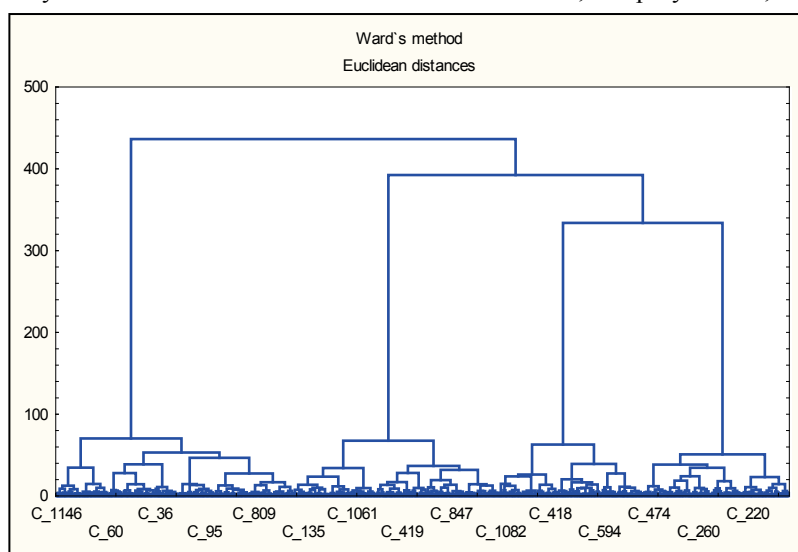


Рисунок 2. Дендрограмма

Classification Matrix					
Rows: Observed classifications					
Columns: Predicted classifications					
Class	Percent Correct	1 p=,3270	2 p=,2753	3 p=,1988	4 p=,1988
1	98,99	394,00	2,00	1,00	1,00
2	100,00	0,00	335,00	0,00	0,00
3	99,59	1,00	0,00	241,00	0,00
4	100,00	0,00	0,00	0,00	242,00
Total	99,59	395,00	337,00	242,00	243,00

Рисунок 3. Классификационная матрица

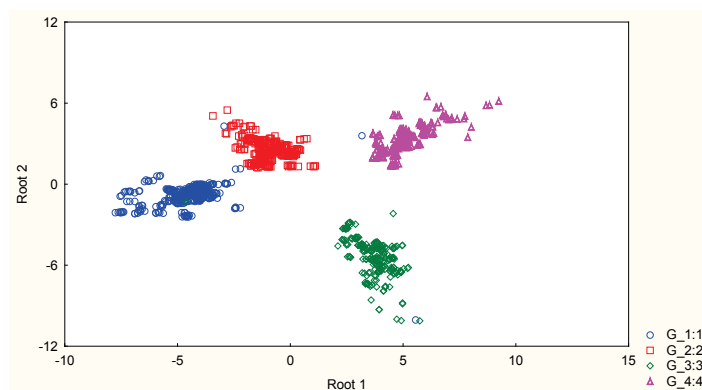


Рисунок 4. Проекция результатов наблюдений на плоскость первых двух канонических переменных

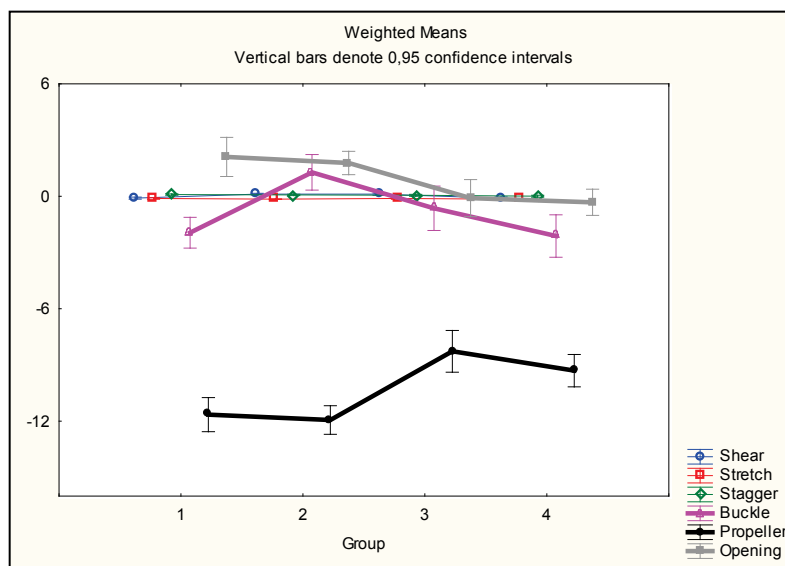


Рисунок 5. Средние значения «диккерсоновых параметров» и 95% доверительные интервалы

однофакторного дисперсионного анализа, подтверждаются и непараметрическими методами. Далее мы использовали методы классификации многомерных данных: кластерный и дискриминантный анализы. Кластерный анализ позволил разбить исходную выборку на четыре однородные группы, класса (рис. 2).

Цель дискриминантного анализа состоит в том, чтобы на основе измерения различных параметров объекта классифицировать его, т. е. отнести к одной из нескольких полученных групп. И определить значения корректных вероятностей классификации. На рисунке 3 приведены результаты дискриминантного анализа, где показано, что вероятность корректной классификации равна ~99%. В дискриминантном анализе используется понятие канонических переменных, которые несут максимальную информацию о взаимном расположении классов относительно друг друга. Поэтому они полезны для геометрического представления результатов дискриминантного анализа. На рисунке 4 приведено графическое представление, т. е. проекция результатов наблюдений на плоскость первых двух канонических переменных. А на рисунке 5 приведены значения средних и 95% доверительные интервалы каждого из «диккерсоновых параметров» от новой переменной, номера класса, Group.

Список литературы / References:

1. Siggers T., Gordan R. Protein–DNA binding: complexities and multi-protein codes. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 4, pp. 2099-2111. DOI: 10.1093/nar/gkt1112.
2. Lu X-J, Olson W.K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.*, 2003, vol. 31, pp. 5108-5121. DOI: 10.1093/nar/gkg680.
3. Xiang-Jun Lu, Wilma K. Olson Characterization of base pair geometry. *Computational Crystallography Newsletter*, 2016, vol. 7, pp. 6-9.
4. Zar J.H. Biostatistical Analysis. *Upper Saddle River*, N.J.: Prentice-Hall, 1999.

MULTIVARIATE STATISTICAL ANALYSIS OF SPATIAL DNA STRUCTURES AT THE INTERFACES OF HOMEODOMEN-DNA COMPLEXES: «DICKERSON PARAMETERS»**¹Polozov R.V., ²Grokhlina T.I., ³Panchenko L.A., ⁴Ivanov V.V.**¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysic, Russian Academy of Sciences
*Pushchino, 142290, Russia; e-mail: polrob@mail.ru*² Institute of Mathematical Problems of Biology, Keldysh Institute of Applied Mathematics, Russian Academy of Sciences*Pushchino, 142290, Russia*³ Lomonosov Moscow State University
*Moscow, Russia*⁴ Joint Institute for Nuclear Research
*Dubna, Russia,*⁵ National Research Nuclear University “MEPhI”
Moscow, Russia

Abstract. Specific complexes of homeodomains with DNA are formed when the protein binds to double-stranded DNA in the B-form (along the wide groove). The classification of protein-DNA complexes and their interfaces according to physicochemical and geometric parameters is associated with solving a number of computational and statistical problems. Classification should provide information on the relationship of complexes with each other, provide an opportunity to trace their evolution and provide a basis for the formulation of recognition rules and the construction of recognition models. To solve the classification problems, it is necessary to compile a list of appropriate descriptors of the complexes and their interfaces, to conduct a multivariate statistical analysis of the data from this list. We use geometric parameters, 3DNA: a software package, of spatial DNA structures at the interfaces of 75 homeodomain-DNA complexes (PDB). This paper presents the results of a multivariate statistical analysis of “Dickerson parameters” of nitrogenous base pairs of DNA at the interfaces of homeodomain-DNA complexes.

Key words: homeodomain-DNA, “Dickerson parameters”, interface, DNA deformation, classification.

О ПРОБЛЕМЕ ВЛИЯНИЯ МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Лобышев В.И.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1/2, г. Москва, 119991, РФ; e.mail: lobyshev@yandex.ru
Поступила в редакцию: 17.07.2020

Аннотация. В работе представлена краткая история и дан анализ этой проблемы, которая долго неоднозначно принимается научным сообществом и в которую внесли значительный вклад отечественные исследователи. Несомненно, это направление связано с исследованиями в области малых доз ионизирующих излучений и слабых неионизирующих электромагнитных полей, а также с результатами гомеопатической практики в медицине, насчитывающей более 200 лет и не имеющей по настоящее время теоретических обоснований. С конца 1970-х годов на различных биологических моделях разными авторами было показано, что при уменьшении от обычно используемой концентрации действующего вещества, биологический эффект вновь появляется. При этом, он может быть более интенсивным или даже иметь другой знак ответа. Таким образом, зависимость биологического ответа на уменьшающуюся концентрацию активного вещества имеет немонотонный характер и может характеризоваться несколькими экстремумами. Исследования физико-химических характеристик концентрационных зависимостей в области малых и сверхмалых концентраций, проведенные в нашей стране и за рубежом, убедительно показывают появление аналогичных закономерностей. Наряду с этим, нами впервые была показана высокая корреляция между физическими характеристиками сильно разбавленных растворов и биологическим откликом одноклеточных, что было подтверждено другими исследователями. Установлено, что неклассическое поведение разбавленных водных растворов связано с образованием мезочастиц размером порядка сотни нанометров. Во многих случаях образование мезочастиц не наблюдается при выдерживании образцов водных растворов в условиях ослабленного магнитного поля Земли. Наблюдаемые эффекты выходят за рамки классических представлений о растворах. В работе формулируются вопросы, требующие экспериментального и теоретического решения.

Ключевые слова: разбавленные водные растворы, микрогетерогенность, самоорганизация, мезочастицы.

Стимулирующее влияние слабых воздействий на биологические системы разнообразных химических и физических факторов, ингибирующих эти системы при больших концентрациях или дозах, было обнаружено очень давно. Первые эксперименты, показывающие в малых дозах стимулирующее влияние различных химических соединений на развитие разнообразных биологических объектов, были опубликованы еще в конце XIX века. Этот феномен был назван гормезисом [1]. Позднее стимулирующее воздействие аналогичного характера было обнаружено и для ионизирующего излучения и было названо радиационным гормезисом [2, 3]. При исследовании действия слабых неионизирующих электромагнитных полей также были обнаружены немонотонные эффекты, зависящие от интенсивности и частоты электромагнитных полей естественного происхождения [4]. Со второй половины 1970-х годов появляется нарастающий поток работ, в которых исследуется широкий диапазон концентраций действующих биологически активных веществ на различные функции биологических и модельных систем [5-11]. На рисунке 1 приведен характерный пример бифазного ответа степени ингибирования протеинкиназы С на концентрацию антиоксиданта α -токоферола [11].

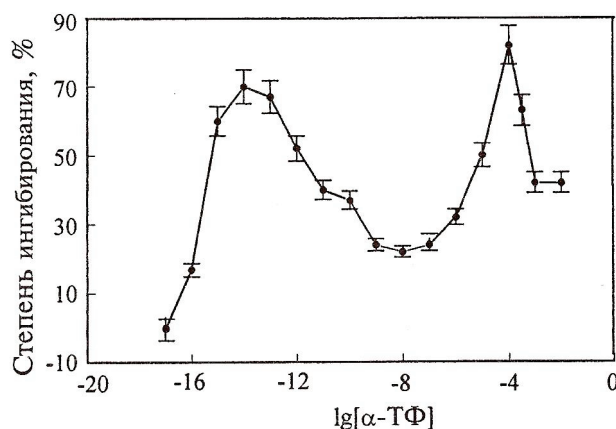


Рисунок 1. Зависимость степени ингибирования протеинкиназы С от концентрации α -токоферола

Необычность этой зависимости состоит в наличии максимума при наличии малых (их называют также сверхмалыми) концентраций действующего вещества и «мертвой зоны», лежащей обычно в области $10^{-8} - 10^{-11}$ М. При повышении концентрации до общепринятых может наблюдаться как активация (в данном примере), так и ингибирование.

Еще одна возможная особенность высокоразбавленных растворов состоит в том, что их значительное действие может проявляться на фоне большей эндогенной концентрации того же вещества в изучаемой модели. Например, опиоиды модулируют иммунную активность различных клеток в концентрациях $10^{-18} - 10^{-14}$ М, хотя те же опиоидные пептиды присутствуют в клетках в значительно большей естественной концентрации $10^{-10} - 10^{-12}$ М [12,13].

Во многих случаях малые концентрации биологически активных веществ достигаются путем однотипного последовательного разбавления (в 10 или 100 раз, или иным способом) с активным механическим встряхиванием после каждого разбавления. Такой метод приготовления образцов соответствует принятой в гомеопатии технологией приготовления препаратов. В этом случае, так называемые, потенцированные образцы со сверхвысокой степенью «разбавления», когда понятие концентрации теряет смысл и уместно говорить только о количестве повторов указанных операций, удивительным образом могут проявлять биологическую активность, зависящую немонотонно от степени «разбавлений». Все эти экспериментальные факты не укладываются в рамки традиционных представлений. Не рассматривая разнообразные предлагаемые механизмы наблюдаемых эффектов, отметим, что во всех случаях мы работаем с водными растворами и возникает вопрос, как ведут себя физико-химические характеристики разбавленных растворов и применимо ли к ним понятие бесконечно разбавленных растворов, под которыми в классической физической химии понимаются растворы с концентрацией менее $10^{-3} - 10^{-5}$ М. Часто утверждают, что наблюдаемые сложные эффекты связаны со структурой воды, не приводя при этом достаточных аргументов. Сначала рассмотрим, что такое реальная вода, поскольку это не только ансамбль молекул H_2O . Она содержит:

- вследствие диссоциации ионы H^+ и OH^- в концентрации 10^{-7} М;
- основные стабильные изотопные формы $H_2^{16}O$, $H_2^{17}O$ и $DH^{16}O$ с концентрациями (если изотопы считать элементами) $^{18}O - 0,20\%$ ($\sim 0,1$ М), $^{17}O - 0,04\%$ ($\sim 0,02$ М), $D = ^2H - 0,015\%$ (~ 15 мМ);
- орто $\uparrow NOH\uparrow$ и пара $\uparrow NOH\downarrow$ молекулы (естественное статистическое распределение форм 3:1);
- растворенные газы, нанопузырьки;
- растворенные органические и неорганические примеси из атмосферы и материала сосуда;
- активные формы кислорода и азота;
- переменный окислительно-восстановительный потенциал;
- громадный полиморфизм кристаллографических структур (Лед XVIII получен в 2018 г из льда VII);
- возможность образования не кристаллографических, параметрических структур.

Все приведенные выше факты убедительно свидетельствуют о том, что реальная вода гетерогенна по своему составу. Рассмотрим более подробно некоторые из перечисленных выше характеристик. В атмосферном воздухе всегда присутствует углекислый газ, обладающий хорошей растворимостью в воде. На рисунке 2 представлены распределения гидрокарбонатов в зависимости от величины pH, варьируемой с помощью добавок HCl и NaOH [14].

Как видно из рисунка 2, в области нейтральных значений pH концентрация аниона бикарбоната составляет около 10^{-5} М. По этой причине дистиллированная вода в открытом сосуде без дополнительных примесей имеет значение pH 5,5 меньше, чем ожидаемое значение pH 7. В воде присутствуют также растворенный кислород и азот, об их роли и о нанопузырьках речь пойдет ниже.

Вода активно растворяет все примеси неорганического и органического происхождения, находящиеся в воздухе и материале сосуда в котором находится вода. Уместно напомнить, что в воздухе для больничных палат

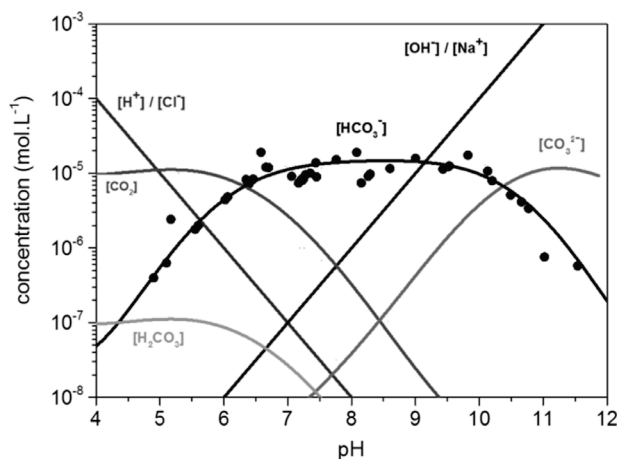


Рисунок 2. Равновесные концентрации карбонатов в воде при стандартных условиях

нормируемое (ГОСТ 2007 – идентичен международному стандарту ISO) количество только лишь колониеобразующих частиц составляет 500 шт/м³, максимальное число «пылевых» частиц размером равным и более 0,5 мкм в операционных помещениях не должно превышать 3 520 000 штук в м³, а их количество в палатах даже не нормируется. Показательным примером могут служить результаты исследования «аномальной» сверхплотной конденсированной воды в кварцевых капиллярах, полученной впервые Н.Н. Федякиным и активно исследуемой в то время Б.В. Дерягиным, в нескольких тысячах экспериментов, выполненных за два года в разных частях земного шара после публикации Липпинкотта о том, что эта вода возможно является полимерной структурой [15]. Оказалось, что кроме растворенного кремния в конденсированной в капиллярах воде обнаруживаются и другие вещества, но только имеющиеся в лаборатории. Наш давний опыт показал, что в стеклянном бидистилляторе электропроводность бидистиллята оказывается выше, чем в дистилляте за счет растворения ионов Na из стекла, что было установлено спектральным анализом. При этом содержание Ca и Mg в бидистилляте действительно уменьшалось. Хотелось напомнить также, что такое вещество как AgCl, считающееся нерастворимым, дает насыщенный водный раствор с концентрацией $1,34 \cdot 10^{-5}$ М.

В настоящее время в основной массе работ можно увидеть фразу: «использовалась вода класса 1 с удельным сопротивлением 18,2 Мом•см». На рисунке 3 представлены результаты измерения электропроводности такой воды во времени при ее нахождении в стеклянном цилиндрическом сосуде диаметром 2,5 см, высотой 11 см. Измерения проводили на кондуктометре CDM 2e, Radiometer (Копенгаген) с калиброванной ячейкой CDC 104, имеющей три кольцевых электрода на внутренней поверхности стеклянной трубки диаметром 1,5 см, высотой 10 см, помещенной в стеклянный цилиндр с исследуемой водой. Погрешность измерений составляла не более 5%.

Как видно из приведенных данных, электропроводность даже в начальной точке значительно выше ожидаемой (из-за переливаний, промывки электрода и т.д.) и быстро возрастает. Медленное увеличение электропроводности долго не прекращается и через неделю достигает $5,1 \text{ мкС} \cdot \text{см}^{-1}$.

В состав воды входят два стабильных изотопа водорода и три изотопа кислорода. Хотя основная часть воды представлена молекулами H₂¹⁶O, количество изотопных форм молекул воды, выраженное в молях, как указано выше, характеризуется достаточно большими величинами, сравнимыми с количеством основных ионов Na, K, Ca, Mg в живой клетке [16]. Наряду с понятными изотопными эффектами обогащенной тяжелой воды, наблюдаются неожиданно большие эффекты при небольшой вариации изотопного состава относительно его

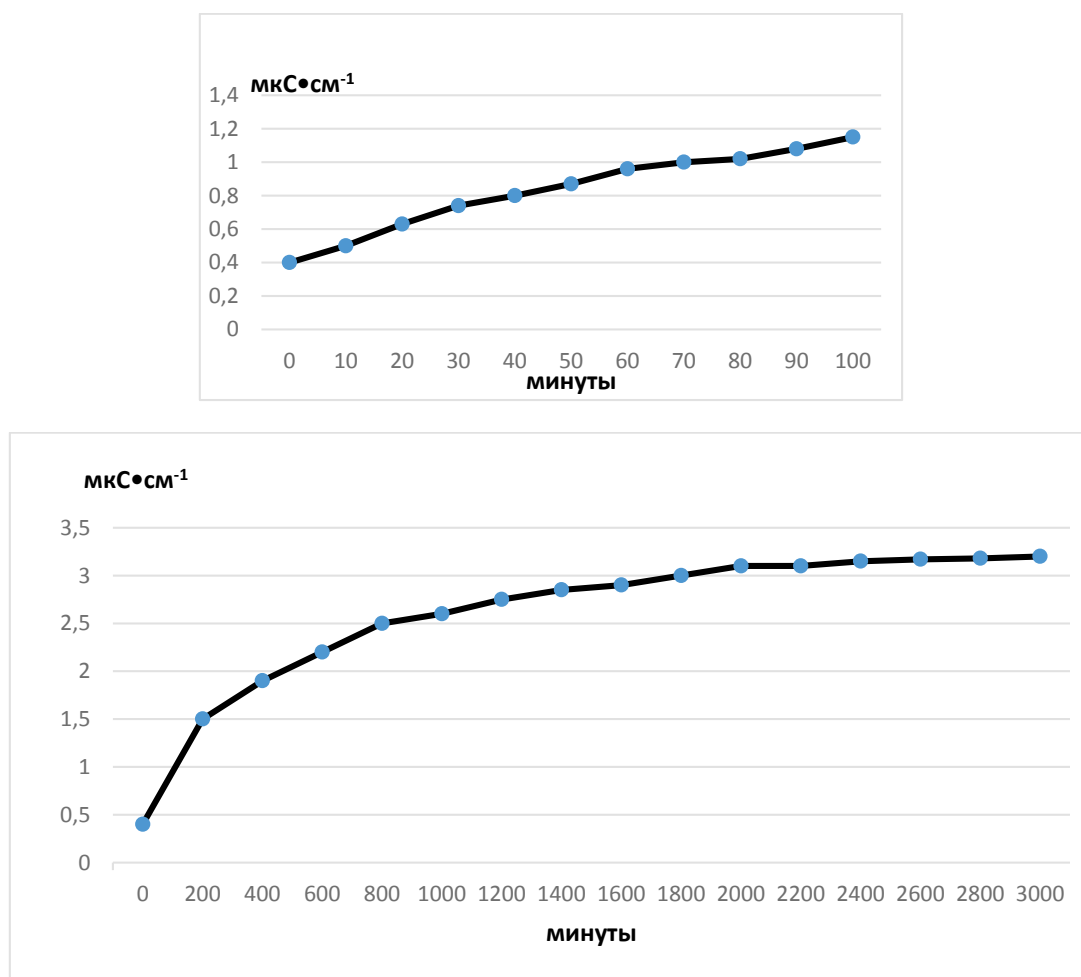


Рисунок 3. Зависимость удельной электропроводности воды MQ от времени

природного состава не нашедшие до сих пор адекватного объяснения [17]. В воде существуют также орто и пара молекулы, различающиеся ориентацией спинов атомов водорода в молекуле и обладающие различающимися энергетическими спектрами вращательных степеней свободы [18, 19]. Их роль в биологических системах еще предстоит прояснить.

Концентрации всех вышеперечисленных компонент зависят от множества внешних условий, включающих предысторию воды, температуру и давление. Самая чистая коммерческая вода для хроматографии “Fisher Scientific” гарантирует отсутствие лишь избранных ионов Al, Cd, Cr, Cu, K на уровне 10 ppb, т.е. на уровне 10^{-8} . Таким образом, условно чистая вода, даже в лабораторных условиях, является раствором, практически всегда неравновесна и нарушает многие устойчивые представления об идеальной жидкости и растворе. **Чистую воду, состоящую только из молекул H_2O , можно наблюдать лишь на листе бумаги или на экране монитора компьютера.**

Вода весьма чувствительна к внешним физическим воздействиям. Уже более 50-ти лет известно, что ультразвуковая кавитация в воде приводит к появлению гидроксил-радикала $OH^\bullet$, нитрит NO_2 и, в меньшей степени, нитрат NO_3 ионов. С разработкой технологии одиночного пульсирующего пузырька удалось на один цикл схлопывания пузырька количественно измерить выход $OH^\bullet$, NO_x , а также фотонов, чей спектр не был характерен и простирался от 800 нм до 200 нм с увеличением интенсивности в коротковолновой части спектра [20]. Спектр такого вида в рамках модели черного тела говорит о температуре внутри пузырька, достигающей 20 000 К, что говорит о возможности ионизации внутреннего содержимого пузырька и последующих ион – электронных рекомбинационных процессов. Появление активных форм кислорода и азота неизбежно влечет за собой каскад сопряженных цепных электрон-радикальных реакций и изменений окислительно-восстановительного потенциала среды весьма важного для функционирования живых систем.

Наряду с этим было обнаружено, что даже при выдерживании воды при температуре 40°C в течение часа в ней появляются активные формы кислорода и молекулы перекиси водорода H_2O_2 [21], а при выдерживании при температуре 70°C даже окислы азота [22]. Аналогичные удивительные эффекты наблюдаются и при освещении воды видимым светом, а также квазимонохроматическим светом небольшой интенсивности в полосах поглощения молекулярного кислорода в видимом и ИК диапазоне спектра [22]. Образование активных форм кислорода под влиянием внешних слабых воздействий приводит к появлению длительных химических преобразований, в том числе, циклического характера [23, 24]. Полной ясности в механизмах описанных наблюдений нет. Известно около 40 реакций в которых участвуют реагенты и продукты кислородно-водородных молекул [25]. Среди них есть как очень быстрые, так и очень медленные реакции, что приводит к длительной эволюции системы [26, 27]. В воде, насыщенной атмосферным углекислым газом, донорами электронов могут выступить анионы гидрокарбонатов и воздействовать на протекание сопряженных цепных электрон-радикальных реакций [28]. В свете всего вышесказанного воду следует рассматривать как сложную неравновесную систему, склонную к самоорганизации.

К появлению активных форм кислорода в воде приводят также такие механические воздействия как ультразвук докавитационной интенсивности, продавливание воды через капилляры и мембраны [29-31]. Наиболее интересен результат, полученный при вибрации сосуда с водой. Такая процедура приводит к появлению не только активных форм кислорода, но и регистрируемого объема выделяющихся газов кислорода и водорода, причем частоты вибраций около 1 Гц оказываются наиболее эффективными [32, 33]. Недавно вышла статья повторяющая появление перекиси водорода при выдавливании микрокапель воды из капилляра [34]. Авторы этой работы не цитируют наших авторов и отмечают, что, хотя вода и является привычной жидкостью, она обладает многими непонятными свойствами. Адекватного понимания механизмов образования активных форм кислорода и, тем более азота, в воде на сегодняшний день не существует. По аналогии с кавитацией можно рассматривать спонтанно образующиеся нанопузырьки [35-37] в качестве кандидатов для объяснения наблюдаемых эффектов, однако эта гипотеза требует экспериментального подтверждения.

Очень часто при анализе сложных эффектов говорят об изменении структуры воды. Это, в принципе, неправильное высказывание. По определению, структура есть совокупность устойчивых связей объекта. Поэтому жидкая вода, обладающая трансляционной подвижностью, структуры не имеет. Можно говорить лишь о ближнем порядке. Вода состоит из самых маленьких трехатомных молекул, единственная из своих гомологов обладает возможностью образования четырех водородных связей в тетраэдрической конфигурации. Это дает возможность самоорганизации пространственной сетки водородных связей и приводит к громадному полиморфизму возможных структур. К настоящему времени известны 18 кристаллических полиморфных структур льда [38]. Молекулярный дизайн некристаллических параметрических структур из тетраэдрических элементов дает возможность построения практически неограниченного множества структур из молекул воды, включая хиральные и фрактальные [39, 40]. В недавнем обзоре исследований, выполненных современными рентгеновскими методами, показано, что жидкая вода является локально неоднородной жидкостью [41]. В ней существуют области тетраэдрически упорядоченной воды низкой плотности (LDL) и менее упорядоченной воды высокой плотности (HDL) между которыми существуют флуктуационные переходы. Авторы обзора отмечают, что ближайшей задачей является определение степеней неоднородности в воде и резкости границ раздела между флуктуирующими областями (*“a burning question is to determine the degree of heterogeneity in water and the sharpness of the boundaries between fluctuating regions”*). При этом авторы перестали пользоваться понятиями льдообразных кластеров, употреблявших ими в более ранних работах.

Как уже говорилось ранее, проблема малых концентраций берет начало из биологических исследований где был зарегистрирован в модельных системах немонотонный ответ на последовательно уменьшающиеся концентрации добавляемых биологически активных препаратов. Но, что же происходит с физическими характеристиками воды при значительном разбавлении? Наши исследования флюоресценции воды и разбавленных растворов пептидов показали наличие флюоресценции у дистиллированной воды, не связанное с возможным наличием примесей гуминовых кислот, резкое возгорание интенсивности люминесценции при уменьшении концентрации люминофора глицилтриптофана до 10^{-7} М и появление пика люминесценции у не люминесцирующего дипептида – глициласпарагина в этом же диапазоне концентраций, а также длительное время эволюции спектров излучения [42-44]. Спектры возбуждения и соответствующие спектры излучения изученных растворов различны, что характерно для кристаллофосфоров. В рамках этого представления область возбуждения была оценена в 100 нм. Структурные неоднородности в бинарных системах, в том числе вода – спирты или другие неэлектролиты известны давно [45]. Было установлено наличие двух максимумов интенсивности рассеянного света. Основной – при мольной доле спирта $X = 0,2-0,5$ и другой, более узкий, при $X = 0,01-0,05$. Основной максимум обусловлен флуктуациями концентрации, а природа максимума при меньшей концентрации окончательно не ясна. Установлено, что равновесие в этих растворах устанавливается в течение длительного времени, вплоть до нескольких дней после смешивания жидкостей [46]. Длительность эволюции этих систем очень похожа на полученные нами в экспериментах с другими водными растворами при значительно меньшей концентрации примесей в воде. Нами были также выполнены эксперименты по изучению флюоресценции ряда последовательно разбавленных растворов NaCl, которые подвергались интенсивному перемешиванию (потенцированию) после каждого десятикратного разбавления [47]. Результаты представлены на рисунке 4.

Было установлено наличие резкого увеличения интенсивности люминесценции в области 10^{-12} М, сохранявшегося в течение длительного времени. Аналогичный паттерн был получен нами позднее в другой лаборатории. Было впервые обнаружено, что многократное потенцирование дистиллированной воды также приводит к увеличению флюоресценции, которая, в отличие от потенцированного раствора хлористого натрия, заметно уменьшается уже в течение недели. Впервые нами была установлена высокая корреляция (коэффициент корреляции $\rho = -0,93$) между интенсивностью флюоресценции раствора хлористого натрия и спонтанной активностью пресноводных одноклеточных организмов, т.е. **между физическими характеристиками и биологической активностью растворов** [48]. Позднее методом NTA (nanoparticle tracking analysis) мы обнаружили в этой области концентраций наличие наночастиц размером 96-115 нм в количестве $3 \pm 2 \cdot 10^8$ частиц/мл. Немонотонное изменение различных физических характеристик и появление наночастиц обнаруживали разными методами в сильно разбавленных растворах, в том числе в потенцированных растворах в которых расчетная концентрация меньше 10^{-20} М [49-54].

Значительная роль в изучении физико-химических характеристик разбавленных растворов принадлежит группе А.И. Коновалова, которая исследовала более 60 химических веществ и установила, что подавляющее большинство из них образуют наночастицы при больших степенях разбавления. При этом установлено, что для

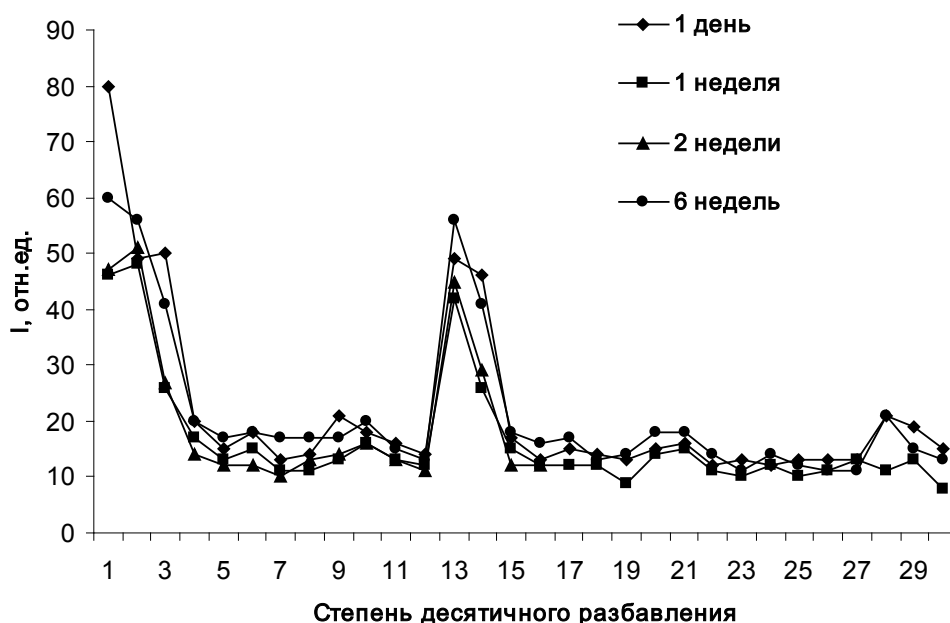


Рисунок 4. Зависимость интенсивности флюоресценции от степени десятичного разбавления хлористого натрия. Образец 13-го десятичного разбавления соответствует концентрации $2 \cdot 10^{-12}$ М. Длина волны возбуждения 300 нм, излучения – 385 нм. Среднеквадратичная погрешность измерения соответствует размеру точки

их самоорганизации, как правило, необходимо наличие естественного электромагнитного фона. При выдерживании растворов в условиях гипомангнитного поля, создаваемым пермалловым экраном, наночастицы в регистрируемом количестве не образуются [55-58]. Этот вывод подтверждается экспериментом с получением наночастиц при выдерживании образцов в поле частотой 7,85 Гц, амплитудой 48 А/м, создаваемом в катушке соленоида, размещенного в пермалловом экране [58].

Существуют, основанные на представлениях квантовой электродинамики, теоретические предпосылки образования в растворах частиц, называемых когерентные домены, размер которых лежит в области сотни нанометров [59-62]. Существуют также работы, в которых предсказывается появление когерентных доменов с большими дипольными моментами и сегнетоэлектрическими свойствами [63], что можно проверить методами диэлектрической спектроскопии. Проведенное нами исследование диэлектрических характеристик разбавленных растворов диклофенака в диапазоне 20 Гц – 10 МГц с помощью прецизионного анализатора импеданса Wayne Kett 65120 BD1 с высокой точностью показало, что релаксационные процессы, а также инкремент диэлектрической проницаемости и в этих растворах не наблюдаются, что говорит об отсутствии доменов с большими дипольными моментами [54].

На сегодняшний день можно считать твердо установленным, что многократное последовательное разбавление растворов традиционным способом, или сопровождающееся интенсивным встряхиванием, приводит к самоорганизации в растворе, проявляющейся в немономонном изменении физико-химических свойств и появлении мезочастиц. Неясен механизм этого феномена, молекулярный состав этих мезочастиц размером в сотни нанометров, а также роль в их образовании слабых электромагнитных полей. В том числе, необходимо выяснить, входят ли нанопузырьки в состав этих частиц.

Список литературы / References:

1. Southam C.M., Ehrlich J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 1943, vol. 33, pp. 517-524.
2. Кузин А.М. *Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы*. М.: Атомиздат, 1977, 133 с. [Kuzin A.M. *Stimulating effect of ionizing radiation on biological processes*. M.: Atomizdat, 1977, 133 p. (In Russ.)]
3. Эйдус Л.Х. *Мембранный механизм биологического действия малых доз*. М.: ИТЭФ РАН, 2001, 81 с. [Aidus L.H. *The membrane mechanism of biological action of small doses*. M.: ITEF RAN, 2001, 81 p. (In Russ.)]
4. Чижевский А.Л. *Земное эхо солнечных бурь*. Изд. 2-е. М.: «Мысль», 1976, 367 с. [Chizhevsky A.L., *Earth's echo of solar storms*. 2-d ed., M.: Mysl', 1976, 367 p. (In Russ.)]
5. Перчихин Ю.А., Шангин-Березовский Г.Н., Раппопорт И.А. Изменение активности аминотрансфераз при воздействии N-нитрозо N-диэтилмочевиной на сыроворотку крови. *Химический мутагенез и создание сортов интенсивного типа*. М.: Наука, 1977, с. 263. [Perchikhin Yu.A., Shangin-Berezovsky G.N., Rappoport I.A. Change of aminotransferase activity under N-nitroso N-diethyl urea influence on blood serum. *Chemical mutagenesis and creation of intensive type varieties*. M.: Nauka, 1977, p. 263. (In Russ.)]
6. Шангин-Березовский Г.Н., Перчихин Ю.А., Колбасин А.А. Влияние малых доз N-нитрозо N-диэтилмочевины на толерантность перепелов к токсичному действию некоторых мутагенов. *Эффективность химических мутагенов в селекции*. Ин-т химфизики АН СССР, 1980. [Shangin-Berezovsky G.N., Perchikhin Yu.A., Kolbasin A.A. Influence of small doses of N-nitroso N-diethyl urea on quail tolerance to toxic action of some mutagens. *Efficiency of chemical mutagens in selection*. Inst. of Chem. Phys., USSR Acad. Sci., 1980. (In Russ.)]
7. Шангин-Березовский Г.Н., Адамов В.Я., Рыхлецкая О.С., Молоскин С.А. Системный характер стимулирующего действия ультрамалых доз супермутагенов. *Улучшение культурных растений и мутагенез*. Ин-т химфизики АН СССР, 1982. [Shangin-Berezovsky G.N., Adamov V.Ya., Rykhletskaia O.S., Moloskin S.A. Systemic character of stimulating action of ultralow doses of supermutagens. *Improvement of cultivated plants and mutagenesis*. Inst. of Chem. Phys., USSR Acad. Sci., 1982. (In Russ.)]
8. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. Высокоактивные тканевоспецифические адгезивные факторы печени и легкого. *Мол. Биол.*, 1977, т. 11, № 5. [Yamskova V.P., Modyanova E.A., Reznikova M.M., Malenkov A.G. Highly active tissue specific adhesive factors of liver and lung. *Mol. Biol.*, 1977, vol. 11, no. 5. (In Russ.)]
9. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Левенталь В.И., Ланковская Т. П., Бочарова О.К., Маленков А.Г. Тканевоспецифические макромолекулярные факторы из печени и легкого: очистка и действие на механическую прочность ткани и клеток. *Биофизика*, 1977, т. 22. [Yamskova V.P., Modyanova E.A., Leventhal V.I., Lankovskaya T. P., Bocharova O.K., Malenkov A.G. Tissue-specific macromolecular factors from the liver and lung: cleaning and action on mechanical strength of tissue and cells. *Biophysics*, 1977, vol. 22. (In Russ.)]
10. Эффекты сверхмалых доз биологически активных веществ. *Росс. Хим. Журн.*, 1999, т. XLIII, № 5. [Effects of ultra-low doses of biologically active substances. *Russ. Chem. Zhurn.*, 1999, vol. XLIII, no. 5. (In Russ.)]
11. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности. *Росс. Хим. Журн.*, 1999, т. XLIII, №5, с. 3-11. [Burlakova E.B. Features of action of ultra-low doses of biologically active substances and physical factors of low intensity. *Russ. Chemistry. Zhurn.*, 1999, vol. XLIII, no.5, p. 3-11. (In Russ.)]
12. Brown S.L., Van Epps D.E. Suppression of T lymphocyte chemotactic factor production by the opioid peptides beta-endorphin and met-enkephalin. *J. Immunol.*, 1985, vol. 134, no. 5, p. 3384-3390.

13. Zaitsev S.V., Sazanov L.A., Koshkin A.A., Sud'ina G.F., Varfolomeev S.D. Respiratory birst inhibition in human neutrophils by ultra-low doses of [D-Ala²] methionine. *FEBS Letters*, 1991, vol. 291, p. 84-86. DOI: 10.1016/0014-5793(91)81109-L.
14. Xibo Yan, Delgado M., Aubry J., Gribelin O., Stocco A., Da Cruz F.B., Bernard J., Ganachaud F. Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water/Hydrophobic Interfaces. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2018, vol. 9, pp. 96-103. DOI: 10.1021/acs.jpclett.7b02993.
15. Lippincott et al. Polywater. *Science*, 1969, vol. 164, pp. 1482-1487. DOI: 10.1126/science.164.3887.1482.
16. Лобышев В.И., Калинин Л.П. *Изотопные эффекты D₂O в биологических системах*. М.: Наука, 1978, 215 с. [Lobyshev V.I., Kalinichenko L.P. *Isotopic Effects of D₂O in Biological Systems*. M.: Nauka, 1978, 215 p. (In Russian)]
17. Лобышев В.И. О чем говорят изотопные эффекты тяжелой воды в биологических и модельных системах. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 3, с. 511-519. [Lobyshev V.I. Talking about the isotopic effects of heavy water in biological and model systems. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 511-519. (In Russ.)]
18. Tikhonov V.I., Volkov A.A. Separation of water into its ortho and para isomers. *Science*, 2002, vol. 216, p. 2363.
19. Pershin S.M. Coincidence of Rotational Energy of H₂O Ortho – Para Molecules and Translational Energy near Specific Temperatures in Water and Ice. *Phys. Wave Phenom.*, 2008, vol. 16, no. 1, pp. 15-25.
20. Didenko Y.T., Suslick K.S. The energy efficiency of formation of photons, radicals and ions during single-bubble cavitation. *Letters to Nature*, 2002, vol. 418, pp. 394-397. DOI: 10.1038/nature00895.
21. Chernikov A.V., Bruskov V.I., Heat-induced Generation of Hydroxyl Radicals and other Redox-active Species in Seawater. *Biophysics*, 2002, vol. 47, no. 5, pp. 773-781.
22. Chernikov A.V., Bruskov V.I., Fixation of atmospheric nitrogen in the water by heat or light with the formation of nitrogen oxides. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2005, vol. 400, no. 1-6, p. 40-43.
23. Gudkov S.V., Bruskov V.I., Astashev M.E., Chernikov A.V., Yaguzhinsky L.S., Zakharov S.D. Oxygen-dependent Auto-oscillations of Water Luminescence Triggered by the 1264 nm Radiation. *J. Phys. Chem. B*, 2011, vol. 115, p. 7693-7698.
24. Gudkov S.V., Karp O.E., Garmash S.A., Ivanov V.E., Chernikov A.V., Bruskov V.I., Monokhin A.A., Astashev M.E., Yaguzhinsky L.S. Generation of reactive oxygen species in water under exposure to visible or infrared irradiation at absorption bands of molecular oxygen. *Biophysics*, 2012, vol. 57, no. 1, pp. 1-8.
25. Ignatiev A.N., Pryakhin A.N., Lunin V.V. Numerical simulation of the kinetics of ozone decomposition in an aqueous solution. *Russian Chem. Bull.*, 2008, vol. 57, no. 6, pp. 1172-1178.
26. Binhi V.N., Sarimov R.M., Relaxation of liquid water states with altered stoichiometry. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 4, pp. 515-519.
27. Belovolova L.V., Glushkov M.V., Vinogradov E.A., Influence of dissolved gases on highly diluted aqueous media. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 4, pp. 524-530.
28. Воейков В.Л., Виленская Н.Д., Ха До Минь, Малышенко С.И., Буравлева Е.В., Яблонская О.И., Тимофеев К.Н. Устойчивое неравновесное состояние бикарбонатных водных систем. *ЖФХ*, 2012, т. 86, № 9, с. 1518-1527. [Voeikov V.L., Vilenskaya N.D., Ha Do Min, Malysenko S.I., Buravleva E.V., Yablonskaya O.I., Timofeev K.N. The stable non-equilibrium state of bicarbonate water systems. *J. Phys. Chem.*, 2012, vol. 86, no. 9, pp.1518-1527. (In Russ.)]
29. Домрачев Г.А., Родыгин Ю.Л., Селивановский Д.А. Механохимически активированное разложение воды в жидкой фазе. *ДАН*, 1993, т. 329, № 2, с.186-188. [Domrachev G.A., Rodygin Yu.L., Selivanovsky D.A. Mechanically activated decomposition of water in liquid phase. *Doklady Acad. Sci. USSR*, 1993, vol. 329, no. 2, pp.186-188. (In Russ.)]
30. Домрачев Г.А., Родыгин Ю.Л., Селивановский Д.А., Стунжас П.А. Об одном из механизмов генерации пероксида водорода в океане. В кн. *Химия морей и океанов*. М.: Наука, 1995, с.169-177. [Domrachev G.A., Rodygin Yu.L., Selivanovsky D.A., Stunzhas P.A. About one of the mechanisms of the hydrogen peroxide generation in the ocean. In: *Chemistry of the Seas and Oceans*. Moscow: Science, 1995, pp. 169-177. (In Russ.)]
31. Веселов Ю.С. Эффект накопления перекиси водорода при обратно-осмотическом опреснении морской воды. *Химия и технология воды*, 1991, т. 13, № 8, с. 741-745. [Veselov Yu.S. Effect of hydrogen peroxide accumulation during reverse osmotic sea water desalination. *Water chemistry and technology*, 1991, vol. 13, no 8, pp. 741-745. (In Russ.)]
32. Styrkas A.D., N.G. Nikishina N.G. Chemical processes in moving water. *Russian Journal of Inorg. Chem.*, 2009, vol. 54, no. 6, pp. 961-968.
33. Styrkas A.D. Composition of gaseous products produced upon oscillations of water. *Russian Journal of Inorg. Chem.*, 2011, vol. 56, no. 7, p. 1029-1031.
34. Lee J.K., Walker K.L., Han H.S., Kang J., Prinz F.B., Waymouth R.M., Nam H.G., Zare R.N. Spontaneous generation of hydrogen peroxide from aqueous microdroplets. *PNAS*, 2019, vol. 116, no. 39, pp. 19294-19298. DOI: 10.1073/pnas.1911883116.
35. Бункин Н.Ф., Индукаев К.В., Игнатьев П.С. Спонтанная самоорганизация газовых микропузырьков в жидкостях. *ЖЭТФ*, 2007, т. 131, № 3, с. 539-555. [Bunkin N.F., Indukaev K.V., Ignatyev P.S. Spontaneous self-organization of gas microbubbles in liquids. *JETP*, 2007, vol. 131, no. 3, pp. 539-555. (In Russ.)]
36. Бункин Н.Ф., Суязов Н.В., Шкиркин А.В., Игнатьев П.С., Индукаев К.В. Кластерная структура стабильных нанопузырей растворенного газа в глубоко очищенной воде. *ЖЭТФ*, 2009, т. 135, № 5, с. 917-937.

- [Bunkin N.F., Suiazov N.V., Shkirin A.V., Ignatiev P.S., Indukaev K.V. Cluster Structure of Stable Nanobubbles of Dissolved Gas in Deeply Purified Water. *JETF*, 2009, vol. 135, no. 5, pp. 917-937. (In Russ.)]
37. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Babenko V.A., Sychev A.A., Lomkova A.K., Kulikov E.S. Laser Diagnostics of the Bubston Phase in the Bulk of Aqueous Salt Solutions. *Physics of Wave Phenomena*, 2015, vol. 23, no. 3, pp. 161-175.
38. Chaplin M. *Water structure and science*. www.lsbu.ac.uk/water
39. Lobyshev V.I., A.B. Solovey A.B., Bulienkov N.A. Computer Modular Design of Parametric Structures of Water. *Biophysics*, 2003, vol. 48, no. 6, pp. 1011-1021.
40. Lobyshev V.I., Solovey A.B., Bulienkov N.A. Computer construction of modular structures of water. *J. Mol. Liquids*, 2003, vol. 106, no. 2-3, pp. 277-297.
41. Nilsson A., Petterson L.G.M., The structural origin of anomalous properties of liquid water. *Nature Communication*, 2015, pp. 1-11. DOI: 10.1038/ncomms9998.
42. Lobyshev V.I., Ryzhikov B.D., Shikhlinskaya R.E., Mazurova T.N. Intrinsic Luminescence of Water and Heavily Diluted Solutions of Dipeptides. *Biophysics*, 1994, vol. 39, no. 4, pp. 557-563.
43. Lobyshev V.I., Shikhlinskaya R.E., Ryzhikov B.D. Experimental evidence for intrinsic luminescence of water, *J.Mol. Liquids*, 1999, vol. 82, no. 1-2, pp.73-81.
44. Lobyshev V.I., Long scale evolution of luminescent properties of water and glycyltryptophan solutions, influence of UV irradiation, In: Optical Diagnostics of Biological Fluids IV, Ed.: A.V.Priezzhev, Toshimitsu Asakura. *Proc. of SPIE*, 1999, vol. 3599, pp. 52-57.
45. Вукс М.Ф. *Рассеяние света в газах, жидкостях и растворах*. Изд. ЛГУ, 1977, 320 с. [Vuks M.F. *Light Scattering in Gases, Liquids and Solutions*. Leningrad Univ. Press, Leningrad, 1977, p. 320. (In Russ.)]
46. Bulavin L.A., Gotsul'skii V.Y., Malomuzh N.P., Chechko V.E., Relaxation and Equilibrium Properties of Dilute Aqueous Solutions of Alcohols. *Russ. Chem. Bull.*, 2016, vol. 65, no. 4, pp. 851-876.
47. Lobyshev V.I., Tomkevitch M.S., Luminescence Study of Homeopathic Remedies, In: Optical Diagnostics and Sensing of Biological Fluids and Glucose and Cholesterol Monitoring, Ed: A.V. Priezzhev, G.L. Cote. *Proc. of SPIE*, 2001, vol. 4263, pp. 59-64.
48. Lobyshev V.I., Tomkevich M.S., Petrushanko I.Yu., Experimental Study of Potentiated Aqueous Solutions. *Biophysics*, vol. 50, no. 3, pp. 416-420.
49. Pershin S.M., Bunkin A.F., Grishin M.Ya., Davydov M.A., Lednev V.N., Palmina N.P., A.N. Fedorov A.N. Correlation of Optical Activity and Light Scattering in Ultra-Low-Concentrated Phenosan-Potassium Aqueous Solutions. *Dokl. Phys.*, 2015, vol. 60, pp. 114-117.
50. Pershin S.M., Bunkin A.F., Grishin M.Ya., Lednev V.N., Fedorov A.N., Palmina N.P. Bimodal Dependence of Light Scattering/Fluctuations on the Concentration of Aqueous Solutions. *Phys. Wave Phenom.*, 2016, vol. 24, no. 1, pp. 41-47.
51. Elia V., Niccoli M., New Physico-Chemical Properties of Extremely Diluted Aqueous Solutions. *J. of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2004, vol. 75, pp. 815-836.
52. Elia V., Ausanio G., Gentile F., Germano R., Napoli E., Niccoli M. Experimental Evidence of Stable water Nanostructures in Extremely Dilute Solutions at Standard Pressure and Temperature. *Homeopathy*, 2014, vol. 103, no. 1, pp. 44-50.
53. Rey L., Thermoluminescence of Ultra-high Dilutions of Lithium Chloride and Sodium Chloride. *Physica A*, 2003, vol. 323, pp. 67-74.
54. Lobyshev V.I. Dielectric Characteristics of Highly Diluted Aqueous Diclofenac Solutions in the Frequency Range of 20Hz to 10MHz. *Physics of Wave Phenomena*, 2019, vol. 27, no. 2, pp. 119-127.
55. Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Y.V., Konovalov A.I., Properties of Supramolecular Nanoassociates Formed in Aqueous Solutions of Biologically Active Compounds in Low or Ultra-low Concentrations. *Doklady Phys. Chem.*, 2009. vol. 428, no. 2, pp. 196-200.
56. Konovalov A.I., Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Y.V., Forming the Nanosized Molecular Assemblies (Nanoassociates) is a Key to Understand the Properties of Highly Diluted Aqueous Solutions. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 3, pp. 341-346.
57. Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Y.V., Konovalov A.I., Self-organization and Physicochemical Properties of Aqueous Solutions of the Antibodies to Interferon Gamma at Ultrahigh Dilution. *Doklady Phys. Chem.*, 2015, vol. 462, no. 1, pp. 110-114.
58. Konovalov A., Ryzhkina I., Maltzeva E., Murtazina L., Kiseleva Yu., Kasparov V., Palmina N. Nanoassociate Formation in Highly Diluted Water Solutions of Potassium Phenosan with and without Permalloy Shielding. *Electromagn. Biol. Med.*, 2015, vol. 34, no 2, pp. 141-146.
59. Preparata G. *QED Coherence in Matter*. World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1995.
60. Arani R., Bono I., Del-Guidice E., Preparata G. QED Coherence and the Thermodynamics of Water. *Int. J. Mod. Phys. B*, 1995, vol. 9, pp. 1813.
61. Del-Guidice E., Vitiello G. Role of the Electromagnetic Field in the Formation of Domains in the Process of Symmetry-Breaking Phase Transition. *Phys. Rev. A*, 2006, vol. 74, p. 022105.
62. Vitiello G, On the Isomorphism between Dissipative Systems, Fractal Self-Similarity and Electrodynamics. Toward an Integrated Vision of Nature Systems. *Systems*, 2014, vol. 2, p. 203. DOI: 10.3390/systems, 2020203.
63. Yinnon T., Liu Z.Q. Domains Formation Mediated by Electromagnetic Fields in Very Dilute Aqueous Solutions: 1. Quantum Electrodynamics Aspects. *Water*, 2015, vol. 7, p. 33. DOI: 10.14294/WATER.2015.4.

ON THE PROBLEM OF LOW CONCENTRATIONS ON BIOLOGICAL ACTIVITY

Lobyshev V.I.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory 1/2, Moscow 119991, Russia; e-mail: lobyshev@yandex.ru

Abstract. The paper presents a brief history and analysis of this problem, which has long been ambiguously accepted by the scientific community and to which Russian researchers have made a significant contribution. Undoubtedly, this theme is associated with research in the field of low doses of ionizing radiation and weak non-ionizing electromagnetic fields, as well as with the results of homeopathic practice in medicine, which has more than 200 years and does not have any theoretical grounds up to now. Since the late 1970s, various authors have shown on different biological models that the biological effect reappears when the concentration of the active substance decreases from the commonly used concentration. However, it may be more intense or even have an opposite sign of response. Thus, the dependence of the biological response to a decreasing concentration of the active substance is non-monotonous and can be characterized by several extremes. Studies of physical and chemical characteristics of concentration dependences in the field of low and ultralow concentrations carried out in our country and abroad, convincingly show occurrence of similar patterns. We have shown for the first time a high correlation between the physical characteristics of highly diluted solutions and the biological response of single-cell organisms, which was confirmed by other researchers. It has been established that the non-classical behavior of diluted aqueous solutions is associated with the formation of mesoparticles about one hundred nanometers in size. In many cases, the formation of mesoparticles is not observed when holding samples of aqueous solutions in the conditions of a weakened magnetic field of the Earth. The observed effects go beyond the classical concepts of solutions. The paper formulates questions that require experimental and theoretical solutions.

Key words: *diluted aqueous solutions, microheterogeneity, self-organization, mesoparticles*

ГЕТЕРОАССОЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛ ТИАЗИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ И КОФЕИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., Албет М.А.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 18.07.2020

Аннотация. Результаты исследования ассоциации молекул метиленового голубого и кофеина в водном растворе методом спектрофотометрии проанализированы с использованием димерной модели. Выполнено разложение экспериментального спектра поглощения смеси гетероциклических молекул на индивидуальные составляющие. По данным отдельных компонентов спектра (по положению и интенсивности полос поглощения), полученным из сопоставления экспериментальных и расчетных спектров методом регуляризации, проведена оценка в точечно - дипольном приближении структурных параметров гетерокомплекса: расстояния и угла между точечными дипольными моментами переходов разнородных молекул 0,34 нм и 38 ° соответственно.

Ключевые слова: спектрофотометрия, поглощение, краситель, кофеин, мономер, димер, гетероассоциация, димерная модель, константы ассоциации, дипольный момент перехода, структурные параметры.

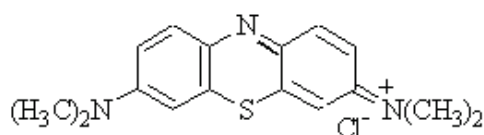
Изучение разнородной ассоциации биологически активных гетероциклических молекул в водном растворе с определением структурных особенностей гетерокомплексов важно для понимания взаимодействия подобных молекул как между собой, так и с биополимерами. Одним из наиболее чувствительных методов исследования нековалентного связывания молекул является электронная спектроскопия, позволяющая получить информацию о структурных параметрах образующихся ассоциатов. При этом существенное значение имеет обработка экспериментальных данных, базирующаяся на решении соответствующих обратных задач.

В работе изучена ассоциация молекул тиазинового красителя – метиленового голубого (МГ) и кофеина в водном растворе методами спектрофотометрии. Краситель МГ относится к классу биологически активных веществ, способных связываться интеркаляционным способом с молекулами нуклеиновых кислот [1]. Чувствительность МГ к различным конформационным перестройкам молекул ДНК в ядрах клеток позволяет использовать его в качестве меток при изучении структурных изменений молекул биополимеров. МГ – активный фотосенсибилизатор, используемый при фотодинамической терапии злокачественных опухолей [2]. Кофеин способен “перехватывать” ароматические красители посредством гетероассоциации [3,4], изменяя тем самым их медико - биологическую активность.

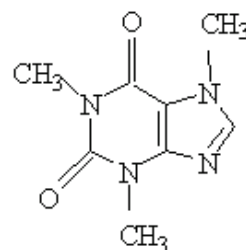
При интерпретации экспериментальных данных использована димерная модель, в которой рассматриваются реакции самоассоциации и образования комплексов 1:1 при гетероассоциации молекул. Модель основывается на законе аддитивности поглощения света и уравнениях теории химических равновесий, позволяющих связать общие концентрации веществ с их равновесными концентрациями в различных молекулярных формах (мономеров, димеров), а также равновесными константами ассоциации [5,6]. Предложена процедура разделения спектра на индивидуальные компоненты с использованием данной модели и экспериментальных спектров, измеренных при различных концентрациях кофеина (рис. 1) [5]. По данным спектральных составляющих, полученным из сопоставления экспериментальных и расчетных спектров, выполнена оценка структурных параметров гетерокомплекса в диполь – дипольном приближении.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Электронные спектры поглощения растворов МГ и кофеина регистрировали, как и ранее [7], в видимой области спектра. Краситель МГ и кофеин (Sigma, США) использовались в экспериментах без дополнительной очистки.



Метиленовый голубой



Кофеин

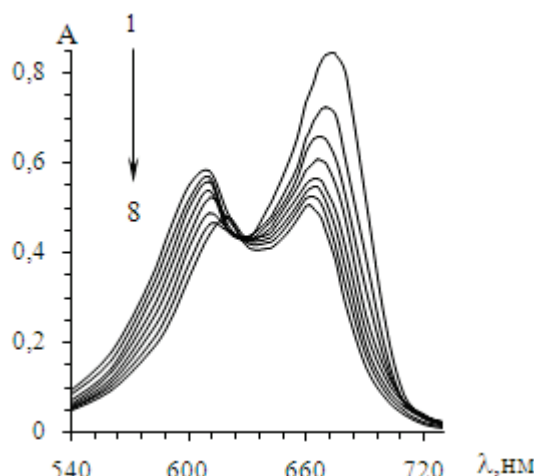


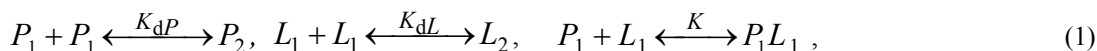
Рисунок 1. Спектры поглощения водного раствора метиленового голубого ($[P_0] = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M} = \text{const}$) при различных концентрациях кофеина: $1.85 \cdot 10^{-2}$ (1), $1.25 \cdot 10^{-2}$ (2), $8 \cdot 10^{-3}$ (3), $4 \cdot 10^{-3}$ (4), $2.25 \cdot 10^{-3}$ (5), $1 \cdot 10^{-3}$ (6), $1 \cdot 10^{-4}$ (7), 0 (8).

При титровании МГ взяты растворы кофеина концентраций в пределах $1 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. Концентрация МГ в смешанном растворе поддерживалась постоянной ($[P_0] = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Измерения проводились в стеклянных кюветах с длиной оптического пути 0,0207 и 0,0505 см при $T = 293 \text{ K}$. Растворы красителя и кофеина готовились в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 6,7) с применением бидистиллированной воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены экспериментальные спектры водных растворов МГ с различным содержанием кофеина. Изменения в спектрах поглощения МГ, а также наличие изобестической точки свидетельствуют о формировании в водном растворе гетерокомплексов [7].

Динамическое равновесие в растворе моделировалось схемой:



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

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

где A_1 и A_2 – оптические плотности свободных и связанных молекул МГ и кофеина при толщине поглощающего слоя исследуемых растворов, равной 1 см:

$$A_1 = \varepsilon_m^P [P_1] + 2\varepsilon_d^P K_{dP} [P_1]^2 + \varepsilon_k^P K [P_1][L_1], \quad A_2 = \varepsilon_m^L [L_1] + 2\varepsilon_d^L K_{dL} [L_1]^2 + \varepsilon_k^L K [P_1][L_1]. \quad (3)$$

Здесь ε_m^P , ε_d^P , ε_m^L , ε_d^L – коэффициенты молярного поглощения лигандов P и L в мономерной и димерной формах соответственно; ε_k^P , ε_k^L – коэффициенты молярного поглощения МГ и кофеина в составе гетерокомплекса; $[P_1]$ и $[L_1]$ – равновесные концентрации мономеров МГ и кофеина.

Ассоциация исследуемых молекул существенно влияет на интенсивность и положение полос их спектров поглощения – они зависят от взаимного расположения мономеров в димерных комплексах. Поэтому из спектров поглощения ассоциатов можно получить информацию о структуре димеров.

Для оценки структурных параметров молекулярных комплексов использованы их спектры, выделенные из экспериментальных спектров (рис. 1), в составе пяти компонентов (двух мономерных и трех димерных). Индивидуальные составляющие (или пять групп параметров: ε_{mi}^P , ε_{mi}^L , ε_{di}^P , ε_{di}^L , ε_{ki}) получены при совместной обработке экспериментальных данных (рис. 1) с использованием равновесных констант K , K_{dP} , K_{dL} [5,7]. Поиск спектральных составляющих, принадлежащий к классу обратных задач, осуществлен путем минимизации функционала:

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

с ограничениями на параметры каждой группы:

$$\varepsilon_{\min i} \leq \varepsilon_i \leq \varepsilon_{\max i},$$

где A_{ji}^{δ} – экспериментальные оптические плотности растворов, измеренные с погрешностью δ , A_{jiq} – расчетные оптические плотности растворов; индекс q – нумерует оптические плотности различных форм ассоциатов; i – номер оптической плотности, соответствующей λ_i ; j – номер спектра (концентрации); $\varepsilon_{\min i}$ и $\varepsilon_{\max i}$ – нижняя и верхняя допустимые границы параметра ε_i . Концентрации $[P_1]$ и $[L_1]$ определяли из уравнений материального баланса [5,6].

При выполнении вычислительной процедуры обработки экспериментальных спектров задача поиска индивидуальных составляющих (или минимизации функционала (4)) заменялась несколькими задачами меньшей размерности. Спектральные характеристики раствора, согласно их физическому смыслу, объединены в три группы, содержащие одинаковое количество параметров. Одной группой параметров ε_{ai} описывается поглощение молекул в ассоциированной форме, остальными (ε_{mi}^P и ε_{mi}^L) – поглощение молекул в свободной форме. Минимизация функционала выполнена варьированием спектральных параметров каждой группы в отдельности внутри физически допустимой области их изменения при фиксированных параметрах остальных групп. На начальном этапе минимизации параметрам ε_{mi}^P и ε_{mi}^L присваивались числовые значения, полученные ранее при изучении самоассоциации молекул МГ и кофеина [5,7]. Параметры ε_{ai} вычислены путем их варьирования до тех пор, пока они не стабилизировались при некотором минимальном значении суммы (4). На следующих этапах минимизации варьируются другие спектральные характеристики, а две оставшиеся группы параметров фиксируются. С учетом положения оптимума суммы (4) в многомерном пространстве спектральные характеристики ε_{ai} , обобщенно отражающие ассоциацию молекул, представляются тремя группами параметров: ε_{ki} , ε_{di}^P и ε_{di}^L , описывающими поглощение молекул в составе димеров: P_1L_1 , P_2 и L_2 . При замене исходной задачи пятью подзадачами сумма квадратов невязок (4) дополняется регуляризующим членом [8,9]:

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

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

$$\text{reg}(\varepsilon_d^P, \varepsilon_m^P, \varepsilon_k, \alpha) = \alpha((\varepsilon_m^P - \varepsilon_{m664}^P)^2 + (\varepsilon_d^P - \varepsilon_{d664}^P)^2 + (\varepsilon_k - \varepsilon_{k664})^2), \quad (6)$$

содержит коэффициент регуляризации α и числовые значения параметров ε_m^P , ε_d^P , ε_k , полученные ранее [7], на длине волны 664 нм (ε_{m664}^P , ε_{d664}^P , ε_{k664}). Регуляризующее звено делает функционал (6) более выпуклым, позволяющим точнее определить компоненты спектра поглощения смеси МГ и кофеина. Выбор регуляризующего решения осуществляется при условии, что невязки не превышают заданную величину δ и

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

Минимизация функционала (5) выполняется при каждом значении коэффициента α и согласовании его с погрешностью измерений δ по сумме квадратов невязок:

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

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

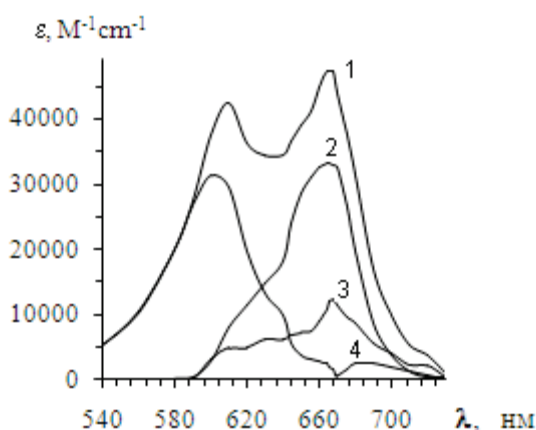


Рисунок 2. Спектр поглощения водного раствора смеси МГ + кофеин ($[P_0] = 2.5 \cdot 10^{-4}$ М; $[L_0] = 2.25 \cdot 10^{-3}$ М) (1) и его отдельные компоненты: 2 – спектр мономеров МГ; 3 – спектр разнородных димеров МГ + кофеин; 4 – однородных димеров МГ + МГ

решения достигается в ходе уточняющего поиска спектральных характеристик, представляющего повторяющиеся решения пяти подзадач минимизации функционала (5). Полученному минимуму функционала соответствует набор спектральных (индивидуальных) составляющих экспериментального спектра (рис. 2).

На рисунке 2 составляющие ε_{mi}^L и ε_{di}^L не представлены, так как в исследуемом диапазоне длин волн числовые значения молярных коэффициентов поглощения кофеина в свободном и димерном состояниях на два – три порядка меньше ε_{mi}^P , то есть оценка пространственных параметров гетерокомплекса проведена по данным ε_{mi}^P и ε_{ki} .

Из сопоставления экспериментальных и расчетных данных следует, что при разнородной ассоциации происходит сдвиг полосы поглощения красителя. Максимум спектра поглощения МГ, входящего в состав гетерокомплекса, смещен относительно полосы свободных молекул МГ (664 нм) в длинноволновую сторону на 4 нм (рис. 2). Димерная составляющая ($\varepsilon_d^P(\lambda_i)$, рис. 2) содержит две полосы поглощения, смещенные в разные стороны по отношению к максимуму поглощения мономеров МГ.

Энергия поглощения молекулы красителя E в составе гетерокомплекса под действием соседней молекулы изменяется [10-12]:

$$E = E_{MG} + 2 \frac{E_{MG} \mu_{MG}^2 \mu_{коф}^2}{(E_{MG}^2 - E_{коф}^2)} G^2, \quad (9)$$

где μ_{MG} и $\mu_{коф}$ – дипольные моменты переходов мономеров МГ и кофеина на длинах волн λ_{MG} и $\lambda_{коф}$, соответствующих максимумам поглощения молекул в свободном состоянии; E_{MG} и $E_{коф}$ – энергии поглощения молекул МГ и кофеина в мономерной форме; G – геометрический фактор, зависящий от взаимного расположения дипольных моментов переходов мономеров в составе гетерокомплекса: $G = (\cos\varphi - 3\cos\theta_{MG} \cos\theta_{коф}) / 4\pi\epsilon_0\epsilon R^3$, где φ – угол между дипольными моментами переходов молекул МГ и кофеина в составе гетерокомплекса, R – расстояние между точечными дипольными моментами переходов молекул МГ и кофеина, θ_{MG} , $\theta_{коф}$ – углы между вектором R , соединяющим μ_{MG} и $\mu_{коф}$, и векторами этих дипольных моментов, ϵ_0 , ϵ – электрическая постоянная и диэлектрическая проницаемость среды.

С учетом выражения (9) в точно-дипольном приближении, длину волны полосы поглощения МГ ($\lambda = 668$ нм) в составе гетерокомплекса можно представить в виде:

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{1}{\lambda_{MG}} + \frac{2\lambda_{MG}^2 \lambda_{коф} \mu_{MG}^2 \mu_{коф}^2 G^2}{(\lambda_{коф}^2 - \lambda_{MG}^2) h^2 c^2}, \quad (10)$$

где c – скорость света; h – постоянная Планка.

Интенсивность полосы МГ (f) в составе гетерокомплекса описывается выражением [10-12]:

$$\frac{f}{f_{MG}} = 1 + \frac{4}{hc} \cdot \frac{\lambda_{MG}^2 \lambda_{коф} \mu_{MG}^2 \mu_{коф}^2 G}{\lambda_{коф}^2 - \lambda_{MG}^2} \cdot \cos\varphi, \quad (11)$$

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

Полученные составляющие экспериментального спектра были использованы для расчета структурных параметров 1:1 гетероассоциата МГ+ кофеин в водном растворе. Взаимное расположение точечных дипольных моментов переходов определяли по положению и интенсивности полос поглощения молекул метиленового голубого в мономерной форме и в составе гетерокомплекса (рис.2) с использованием формул (10) и (11). Данные спектральной полосы (f) [12], а также структур гетерокомплексов образуемых кофеином с молекулами, подобными МГ [3,4], позволяют предположить, что исследуемые молекулы образуют стопочные гетероассоциаты. Оценочные значения структурных параметров гетерокомплекса составляют: $\theta_{\text{коф}} = \theta_{\text{МГ}} = \pi/2$, $\varphi = 38^\circ$, $R = 0,34$ нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При совместной обработке спектров поглощения водных растворов смеси гетероциклических молекул, измеренных при различных концентрациях кофеина с применением димерной модели, выполнено разделение экспериментального спектра на индивидуальные компоненты. По данным спектральных составляющих, полученным из сопоставления экспериментальных и расчетных спектров методом регуляризации с использованием параметров $K_{\text{дР}}$, $K_{\text{дЛ}}$, K , $\epsilon_{\text{м}664}^P$, $\epsilon_{\text{д}664}^P$ и $\epsilon_{\text{к}664}$, выполнена оценка углов между дипольными моментами переходов молекул тиазинового красителя и кофеина, и расстояния между плоскостями хромофоров взаимодействующих молекул в гетерокомплексе состава 1:1. Полученные значения структурных параметров, в значительной степени зависят от структурных особенностей хромофоров ассоциирующих молекул и их дипольных моментов переходов. Детальный анализ ассоциации гетероциклических молекул важен для выяснения сиквенс-специфичного взаимодействия лигандов с биополимерами.

Список литературы / References:

1. Abe H., Wagner S.J. Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivative or merocyanine 540 photosensitization. *Photochem Photobiol*, 1995, vol. 61, pp. 402-409.
2. Orth K., Ruck A., Beck G., Stanescu A., Beger H.G. Photodynamic therapy of small adenocarcinomas with methylene blue (in German). *Chirurg*, 1995, vol. 66, pp. 1254 -1257.
3. Larsen R. W., Jasuja R., Hetzler R., Muraoka P.T., Andrada V.G., Jameson D.M. Spectroscopic and molecular modelling studies of caffeine complexes with DNA intercalators. *Biophys. J*, 1996, vol. 70, pp. 443-452.
4. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer. *Eur. J. Biophys*, 2001, vol. 30, pp. 354-366.
5. Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н. Гетероассоциация молекул кофеина и фенантридинового красителя в водном растворе. *Журн. прикл. спектр.*, 2018, т. 85, № 4, с. 532-537. [Baranovskiy S.F., Chernyshev D.N. Complexation Heteroassociation of caffeine and a phenanthridine dye in aqueous solution. *J. Appl. Spectrosc.*, 2018, vol. 85, no. 4, pp. 588-593. (In Russ.)]
6. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н. Исследование ассоциации красителей акридинового ряда методом протонного магнитного резонанса. *Хим. физика*, 1986, т. 5, с. 318-323. [Veselkov A.N., Baranovskiy S.F., Djimant L.N. Study of the association of the acridine dyes by means of proton magnetic resonance. *Russ. J. Phys. Chem.*, 1986, vol. 5, pp. 318-323. (In Russ.)]
7. Барановский С.Ф., Болотин П.А., Евстигнеев М.П. Агрегация 1,3,7 – триметилксантина с метиленовым голубым в водном растворе. *Журн. прикл. спектр.*, 2006, т. 73, № 2, с. 158-163. [Baranovskii S.F., Bolotin P.A., Evstigneev M.P. Aggregation of 1,3,7-trimethylxanthine with methylene blue in aqueous solution. *J. Appl. Spectrosc.*, 2006, vol. 73, no. 2, pp. 171-177. (In Russ.)]
8. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. *Методы решения некорректных задач*. М.: Наука, 1979, 285 с. [Tikhonov T.N., Arsenin V.Y. "The Methods of Solution of incorrect Problems, Moscow: Nauka, 1979, 285p. (In Russ.)]
9. Тихонов А.Н., Гончарский А.В., Степанов В.В., Ягола А.Г. *Численные методы решения некорректных задач*. М.: Наука, 1990, 230 с. [Tikhonov A.N., Goncharsky A.V., Stepanov V.V., Yagola A.G. *Numerical Methods for the Solution of incorrect Problems*. Moscow, Nauka, 1990, 230 p. (In Russ.)]
10. Tinoco J. Hypochromism in polynucleotides. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, vol. 82, pp. 4785-4790.
11. Rhodes W. Hypochromism and other spectral properties of helical polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, vol. 83, pp. 3609-3617.
12. *Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот* (ред.: Лазуркин Ю.С.). М.: Наука, 1967, 323 с. [Physical methods of investigation of proteins and nucleic acids (ed.: Lazurkin Yu.S.). Moscow: Nauka, 1967, 323 p. (In Russ.)]

HETEROASSOCIATION OF THIAZINE DYE MOLECULES AND CAFFEINE IN AQUEOUS SOLUTION

Baranovskiy S.F., Chernyshev D.N., Albet M.A.

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Abstract. The results of the study of the association of methylene blue and caffeine molecules in aqueous solution by spectrophotometry were analyzed using a dimer model. The decomposition of the experimental absorption spectrum of a mixture of heterocyclic molecules into individual components is performed. According to the data of individual components of the spectrum (position and intensity of absorption bands) obtained from comparison of experimental and calculated spectra by regularization, the structural parameters of the heterocomplex were estimated in the exact-dipole approximation: the distance and angle between the point dipole moments of transitions of dissimilar molecules 0.34 nm and 38 °, respectively.

Key words: *spectrophotometry, absorption, dyes, caffeine, monomer, dimer, hetero - association, dimer model, association constant, transition dipole moment, structural parameters.*

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ПРЕДЕЛЬНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ В ГОРИЗОНТАЛЬНОМ ФОТОБИОРЕАКТОРЕ

Чекушкин А.А., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г.

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

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

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. В работе приведены данные о суточном и сезонном изменении притока солнечной радиации на рабочую поверхность фотобиореактора. Полученные результаты близки к справочным данным, указанным в литературе для г. Севастополя географическая широта $44,5^\circ$ за 1966 г. и 1988 г. Измерения проводились с сентября 2019 г. по июнь 2020 г. включительно на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского» г. Севастополя. В качестве измерительного устройства использовали ранее разработанный автоматический датчик освещённости на базе микроконтроллера Arduino. Основным элементом датчика являлся CdS фоторезистор GL125. Показано, что максимум поглощения фоторезистора приходится на 593 нм, чувствительность в 1,2 раза выше, чем у люксметра. Для пересчёта единиц освещённости в облучённость использовали солнечные спектры при различной высоте над горизонтом для географической широты г. Севастополь. Усреднённый коэффициент перевода клк в Вт/м² для используемого фоторезистора составил 4,26. Определены количества энергии ФАР в синем, зелёном и красном диапазонах солнечного спектра. Показано, что для наших условий зимой количество красных лучей в солнечном свете в 1,22 раза выше, при этом в синей части наблюдается убыль световой энергии в 1,5 раза. При оценке предельной продуктивности культуры микроводорослей использовали средние значения калорийности 21 кДж/г и КПД фотобиосинтеза 5,58 %. За период наблюдений минимальная величина урожая отмечена за декабря – 133 г СВ/м², а максимальная за июня – 824 г СВ/м². Полученные результаты можно рассматривать как некие предельные значения, которые могут использоваться при проектировании промышленных производств микроводорослей на территории южных регионов России.

Ключевые слова: солнечный спектр, моделирование, ФАР, предельная продуктивность, КПД фотобиосинтеза.

Исследования закономерностей, связывающих эффективность и скорость фотобиосинтеза микроводорослей являются одной из актуальных задач в современной физиологии фотоавтотрофных организмов. В промышленных масштабах культуры низших фотоавтотрофов (микроводорослей), как правило, выращивают в открытых фотобиореакторах в условиях естественного освещения, что обуславливает суточную ритмику роста и биосинтеза. Например, при выращивании *A. platensis* в естественном свето-темновом цикле было обнаружено, что за ночь содержание углеводов в органической массе уменьшалось почти вдвое, с 34 до 19 %, а содержание белка увеличивалось с 57 до 71 % при незначительном уменьшении доли липидов [1]. В течение дня пропорции биохимических компонентов клеток возвращались к исходным величинам. Аналогичные данные были получены и для планктонных водорослей, причем авторы наблюдали прямую корреляцию между уменьшением углеводов и скоростью дыхания [2].

На сегодняшний день для регистрации уровня обеспеченности культуры микроводорослей световой энергией используются различные приборы: пиранометры, квантометры, люксметры, поэтому в научных публикациях значение фотосинтетически активной радиации (ФАР) приводится в различных единицах измерения. В отечественной литературе данная величина преимущественно указывается в люксах или ваттах на квадратный метр, а в зарубежной – в микроэйнштейнах на единицу площади в единицу времени. Для сравнения данных о росте микроводорослей удобно использовать коэффициенты перехода между различными единицами измерения количества световой энергии. Эти коэффициенты можно рассчитать исходя из спектра источника излучения [3]. В условиях естественного освещения спектральный состав солнечной энергии, положение максимума и граница излучения в УФ диапазоне определяется высотой солнцестояния. При уменьшении высоты солнцестояния солнечный спектр обогащается красными лучами, максимум излучения смещается в длинноволновую область [4]. Следовательно, для различных высот солнцестояния коэффициенты перевода фотометрических единиц в энергетические изменяются.

Таким образом, первым шагом при моделировании влияния периодически изменяющихся световых условий на продуктивность культуры и продукцию основных биохимических составляющих является разработка автоматической системы контроля основных параметров внешней среды. Обычно, автоматические средства контроля световых условий являются дорогостоящим оборудованием, либо выполнены под задачи конкретного исследования или производства. Ранее нами предложен автоматический датчик измерения освещённости и температуры на базе платформы Arduino Nano [5]. Данные о притоке энергии ФАР, полученные с такого датчика, необходимы при исследовании суточной и сезонной динамики продуктивности микроводорослей в условиях естественного освещения. В общем случае, продуктивность микроводорослей определяется множеством

факторов, основным из которых являются световые условия. Поэтому при сравнительных оценках уровня обеспеченности световой энергией удобно использовать понятие предельной продуктивности, которое подразумевает максимальную скорость роста микроводорослей в данных условиях [6]. При этом состав питательной среды, температурные условия, pH культуры не являются лимитирующими факторами и способствуют максимальному приросту.

Цель работы – определение сезонного изменения величины облучённости фотобиореактора и предельной продуктивности культуры микроводорослей в условиях естественного освещения в районе г. Севастополь.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН». Культивирование микроводорослей в условиях естественного освещения осуществлялось в альгобиотехнологическом модуле, расположенном в г. Севастополе на территории РБК ФИЦ ИнБЮМ. Модуль выполнен на базе многоцелевой оцинкованной конструкции «Урожай-Абсолют», покрытой сотовым поликарбонатом 4 мм. Размеры модуля 4 м на 3 м, высота в верхней точке арки 2,5 м. Модуль оборудован двумя дверными проёмами с обоих торцов, в верхней части которых находятся форточки. Трубные арки и стингера изготовлены из оцинкованной трубы 25х25 мм и соединяются при помощи вставок. По центру выполнен технологический проход шириной 1 м, по обеим сторонам которого находятся прямоугольные бассейны, глубиной 10 см. Модуль электрифицирован 220 В, подведена морская и пресная вода. Каркас каждого бассейна изготовлен из необрезной доски шириной 150 мм, бассейны выстелены полиэтиленовой плёнкой. Перемешивание культуры микроводорослей осуществлялось аквариумной помпой Barbus pump 001 (400 л/ч). Модуль оснащён баллоном с углекислотой, которая необходима для нормального роста и развития водорослей.

Модуль оборудован автоматической системой контроля параметров роста микроводорослей и внешней среды. Автоматический датчик измерения освещённости располагается на внешней стороне модуля. Датчик разработан на базе платформы Arduino Nano [5]. Платформа может получать питание через USB-подключение или от регулируемого 6-20 В внешнего источника. В нашей схеме для стабильной работы Arduino Nano использовался импульсный понижающий регулируемый стабилизатор постоянного напряжения DC-DC LM2596. Запись данных, полученных с аналоговых входов датчика, осуществлялась в текстовый файл на 2 Gb SD-карту памяти, которая подключалась с помощью модуля MicroSD Card к контактам платы: CS к D4, SCK к D13, MOSI к D11, MISO к D12. Основным элементом датчика являлся CdS-фоторезистор GL12516. Отметим, что максимум поглощения световой энергии приходился в зелёную область спектра, что имеет значение при записи освещённости в области ФАР. Для получения спектральной характеристики фоторезистора использовали фотокалориметр Unico-2100. Калибровка датчика выполнялась по люксметру Ю-116.

Исходными данными для расчётов количества энергии ФАР являлись показания датчика внешней освещённости и солнечный спектр при различной высоте солнцестояния [4, 7]. Расчёты выполнялись с использованием электронной таблицы Excel, математического графического пакета SciDavis.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Датчик регистрировал значения внешней освещённости с интервалом 10 мин с 16 сентября 2019 г по 30 июня 2020 г. На рисунке 1 представлены экспериментальные данные.

Для определения количества солнечной энергии ФАР, приходящейся на поверхность бассейна с микроводорослями, необходимо перевести величины освещённости в энергетические единицы. Для этого используем соотношение [3]:

$$E_0 = 1,464 \cdot 10^{-3} \cdot N \cdot E,$$

где E_0 – облучённость, Вт/м²; E – освещённость поверхности, лк, N – отношение величин полной и определяемой датчиком световой энергии.

Рассчитаем значение отношения величин полной и определяемой датчиком световой энергии N с учётом географической широты г. Севастополя и высоты солнцестояния. По литературным данным [7], для г. Севастополя максимальная высота солнца над горизонтом варьирует от 22° до 70°. На рисунке 3 приведены солнечные спектры [4] при его различной высоте над горизонтом, а также спектральная характеристика фоторезистора GL12516. Отметим, что максимум поглощения на 593 нм отличался от заявленного производителем в 560 нм [8]. Чувствительность используемого фоторезистора, численно равная площади под нормированной кривой спектральной характеристики, в 1,2 раза выше, чем у люксметра [3].

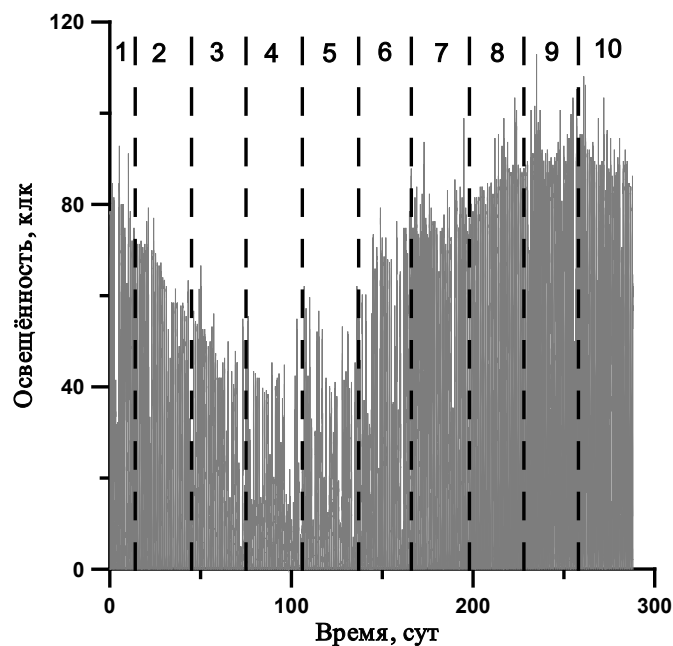


Рисунок 1. Изменение внешней освещённости в альгобиотехнологическом модуле РБК ФИЦ ИнБЮМ г. Севастополя. По оси абсцисс отсчёт времени с 16 сентября. 1 – сентябрь ... 10 – июнь 2020 г.

Рассчитаем отношение величин полной и определяемой датчиком световой энергии. Для этого вычислим долю энергии δ_i , которая приходится на каждую длину волны: просуммируем все величины относительной мощности излучения $\Phi(\lambda)$ (см. рис. 2А), далее для каждой длины волны разделим относительную мощность на полученную сумму. Умножая δ_i на соответствующее относительной чувствительности фоторезистора $V(\lambda)$ (см. рис. 2Б), определим количество световой энергии $\Phi(\lambda) V(\lambda)$. Пример расчёта для высоты солнцестояния 65 градусов представлен в таблице 1. Отметим, что спектры были предварительно интерполированы кубическим сплайном с шагом 1 нм.

С учётом указанных спектров (рис. 2А, кривая 1), для высоты солнцестояния 65° величина N составляет:

$$N = \frac{\sum_{380}^{779} \Phi(\lambda)}{\sum_{380}^{779} \Phi(\lambda) \cdot V(\lambda)} = \frac{22436}{7717} = 2,91.$$

Для остальных высот солнца расчёты величины N аналогичны. Коэффициент перехода от единиц освещённости (клк) к облучённости (Вт/м²) $K_{\text{ЛВ}}$ равен произведению N на $1,464 \cdot 10^{-3}$ Вт/лм. Отметим, что величины коэффициентов перехода в общем случае зависят от высоты солнцестояния. Однако для г. Севастополь минимальная высота не ниже чем 22°, поэтому в дальнейших расчётах будем использовать значение:

$$K_{\text{ЛВ}} = 1,464 \cdot 10^{-3} \cdot 2,91 = 4,26.$$

Таблица 1. Пример расчёта суммарной мощности источника излучения и суммарной мощности в области ФАР для 65 градусов

λ	$\Phi(\lambda)$	$V(\lambda)$	$\Phi(\lambda) V(\lambda)$
380	22,54	0,025	0,580232
381	23,04	0,026	0,610568
382	23,37	0,027	0,63664
...			
545	63,72	0,33	21,01
546	63,68	0,33	21,17
547	63,65	0,34	21,34
...			
778	45,45	0,06	2,92
779	45,36	0,06	2,89
Σ	22436		7717

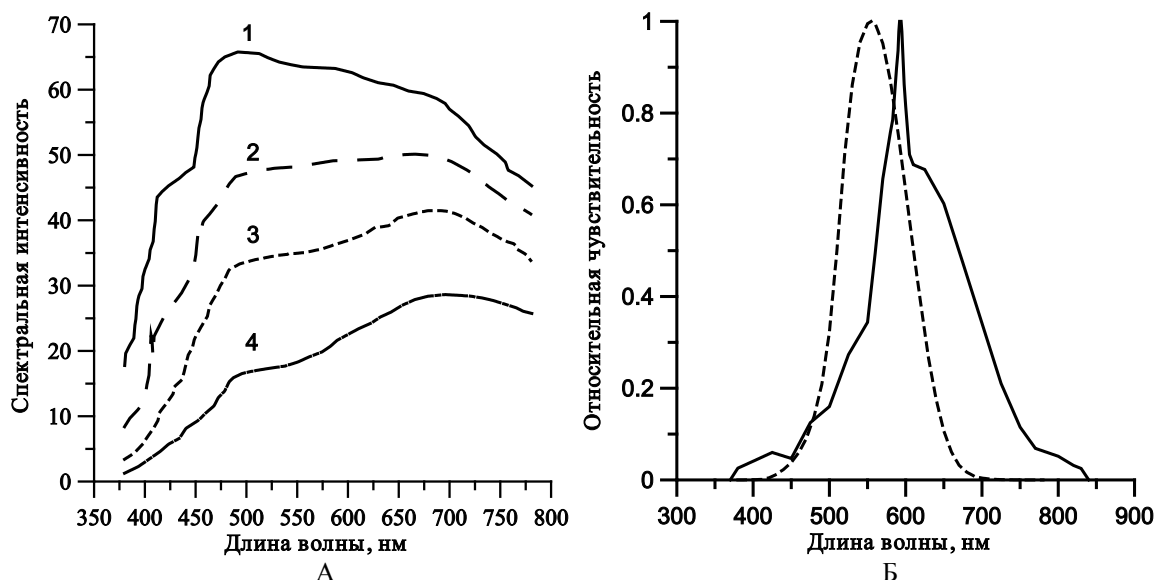


Рисунок 2. А – распределение энергии в солнечном спектре на поверхности Земли в области ФАР при разной высоте солнцестояния [4]: 1 – 65°; 2 – 30°; 3 – 19°; 4 – 11°. Б – спектральная характеристика фоторезистора GL12516. Пунктиром показана относительная видимость [3]

Во многих литературных источниках световая энергия представлена в микромолях квантов (в микроэйнштейнах) на единицу площади в единицу времени. Для расчёта числа молей квантов необходимо определить долю световой энергии, приходящуюся на каждую длину волны в области ФАР δ_i . Далее рассчитать количество энергии для каждой длины волны, с учётом энергии одного кванта определить число квантов на каждой длине волны. Окончательно, найти суммарное количество квантов и полученное значение разделить на число Авогадро [3].

Для культур микроводорослей известно [9], что не только количество энергии ФАР, но и спектр используемого источника света во многом определяет пигментный и биохимический состав клеток. В спектре поглощения культуры микроводорослей можно выделить три области: синяя (380-500 нм) и красная (600-780 нм) где клетки поглощают большую часть падающего света, и зелёная (500-600 нм), где большая часть света пропускается. Для расчёта количества энергии в синем, зелёном и красном диапазонах солнечного спектра в области ФАР необходимо найти сумму долей энергии ($\sum \delta_i$) для каждого диапазона:

$$E_{\text{син}} = \sum_{380}^{500} \delta_i \cdot E_s, \quad E_{\text{зел}} = \sum_{500}^{600} \delta_i \cdot E_s, \quad E_{\text{кр}} = \sum_{600}^{780} \delta_i \cdot E_s,$$

где $E_{\text{син,зел,крас}}$ – энергия в синем, зелёном и красном диапазоне солнечного спектра в области ФАР, E_s – суммарное количество энергии в области ФАР, приходящее на поверхность бассейна.

Результаты расчётов, представленные на рис. 3, показывают, что зимой количество красных лучей в солнечном свете в 1,22 раза выше, при этом в синей части наблюдается убыль световой энергии в 1,5 раза. Так как микроводоросли в промышленных масштабах обычно выращивают при условиях естественного освещения, полученные данные важны для оценки качества получаемой биомассы. Например, для цианобактерии *Arthrospira platensis* показано, что избыток красного света приводит к перераспределению синтеза компонентов фотосистемы ФС в пользу фотосинтетической единицы 2 ФС2, в то время как добавление в спектр освещения желтого света вызывает повышение синтеза в клетках фикобилинового пигмента фикоцианина [10].

Для определения предельной продуктивности P_0 воспользуемся выражением [11]:

$$P_0 = \eta \frac{E_s}{R},$$

где η – КПД фотобиосинтеза, R – калорийность биомассы микроводорослей.

Известно, что средняя калорийность биомассы микроводорослей составляет около 21 кДж [11]. Согласно литературным данным КПД фотобиосинтеза определяется количеством поглощённой световой энергии и имеет сложный характер зависимости от поверхностной облучённости культуры [11]. Для зелёных микроводорослей зависимость КПД от облучённости представлена на рисунке 4.

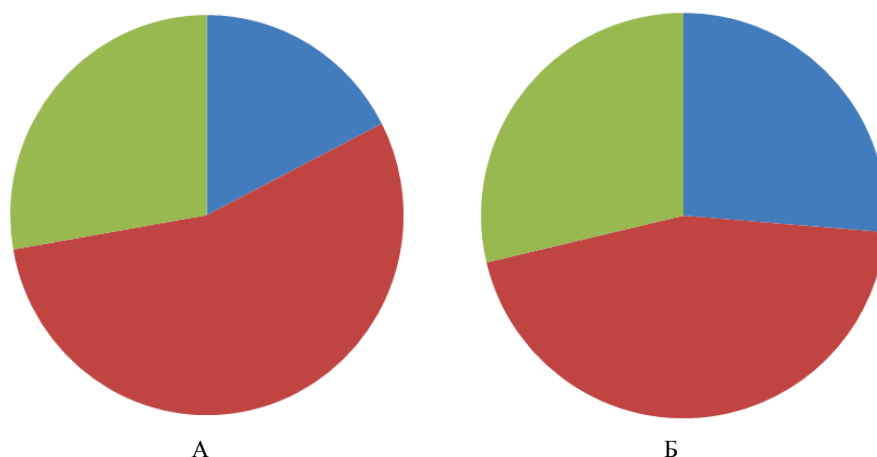


Рисунок 3. Доля энергии в синем, зелёном и красном диапазоне солнечного спектра на поверхности Земли в области ФАР в (А) декабре (17 : 28 : 55 % соответственно) и (Б) мае (26 : 29 : 45 % соответственно)

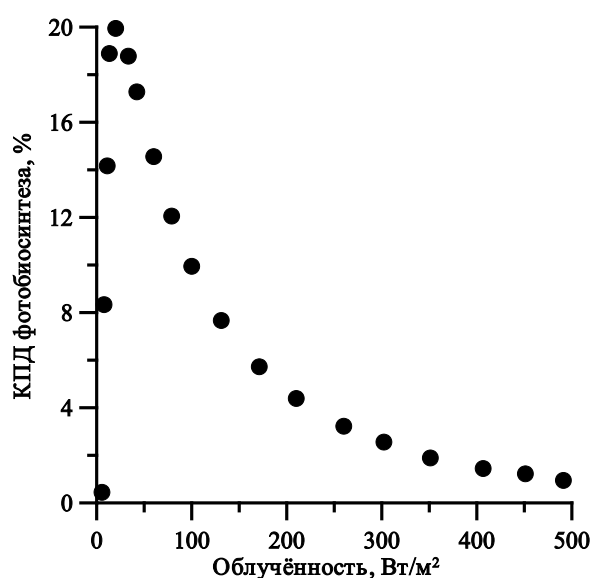


Рисунок 4. Зависимость КПД фотобиосинтеза от облучённости для *Tetraselmis viridis* [11]

Среднее значение КПД для всего диапазона облучённости от 5 до 491 Вт/м² составит:

$$\eta = \frac{\int_5^{491} \eta(E) dE}{491 - 5} \cdot 100\% \cong 5,58 \text{ \%}.$$

Окончательно, значения суммарного количества энергии в области ФАР, приходящее на поверхность бассейна E_s и предельной продуктивности P_0 , представлены в таблице 3.

Таблица 3. Изменение суммарной энергии ФАР и предельной продуктивности культуры микроводорослей в 2019-2020 гг. E_s , – оригинальные данные облучённости.

	Октябрь	Ноябрь	Декабрь	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
E_s , МДж/м ²	152	87	50	61	113	210	289	302	310
По данным [7], МДж/м ²	161	86	56	65	90	167	243	308	337
По данным [12], МДж/м ²	160	82	53	63	89	171	240	300	354
средняя P_0 , г СВ/м ² в сут	404	231	133	162	300	558	768	802	824

Полученные значения притока энергии ФАР близки к справочным данным за 1966 г. [7] и 1988 г. [12], указанным в литературе для нашей географической широты. Таким образом, полученные данные о суточных и сезонных изменениях притока ФАР могут быть использованы в модельных системах прогноза роста и биосинтеза культур микроводорослей. Величина урожая за июнь 2020 г. составляет 824 г СВ/м², при этом предельная продуктивность равна 27 г СВ/(м²·сут), что близко к экспериментально определённой для культуры *A. platensis* по данным [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследована сезонная динамика облучённости промышленного фотобиореактора (бассейна) с культурой микроводорослей и выполнена теоретическая оценка предельной продуктивности при их выращивании в условиях естественного освещения района г. Севастополь. Данные облучённости получены с помощью ранее предложенного датчика на базе Arduino [5]. Стандартные фотометрические датчики для Arduino не подходят для наших условий, потому что регистрируемая максимальная освещённость в г. Севастополе гораздо выше их предельных параметров. При пересчёте величины освещённости в облучённость необходимо учитывать спектральную чувствительность используемого фоторезистора, которая может отличаться от заявленной производителем [8] и чувствительности люксметра. Кроме того, коэффициент пересчёта лк в Вт/м² зависит от солнечного спектра, который в свою очередь меняется от высоты солнца над горизонтом.

Рассчитанные значения предельной продуктивности в реальных условиях будут заведомо ниже, т.к. часть энергии ФАР будет поглощаться и отражаться от поверхности бассейна и кровельного материала альгобиотехнологического модуля. Кроме того, на скорость роста микроводорослей оказывают значительное влияние физико-химические условия среды, фотоингибирование в полуденное время и пр. Тем не менее, полученные результаты можно рассматривать как некий предел при организации промышленных производств на территории южных регионов России.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», № гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6 и в рамках научного проекта № 18-44-920009.

Список литературы / References:

1. Torzillo G., Sacchi A., Materassi R., Richmond A. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 1991, vol. 3, pp. 103-109.
2. Markager S., Sand-Jensen K. Patterns of night-time respiration in a dense phytoplankton community under a natural light regime. *J. Ecol.* 1989, vol. 77, pp. 49-61.
3. 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.)]
4. Клешнин А.Ф. Растение и свет: теория и практика светокультуры растений. М.: Изд-во АН СССР, 1954, 460 с. [Kleshnin A. F. Plant and light: theory and practice of plant light culture. M.: Izd-vo AN SSSR, 1954, 460 p. (In Russ.)]
5. Чекушкин А.А., Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Моделирование суточных колебаний освещённости в районе г. Севастополя. *Актуальные вопросы биологической химии и физики*, 2018, т. 3, № 3, с. 547-552. [Chekushkin A.A., Lelekov A.S., Trenkenshu R.P. Modeling of daily fluctuations of illumination in the area of Sevastopol. *Actual problems of biological chemistry and physics*, 2018, vol. 3, no. 8, pp. 547-552. (In Russ.)]
6. Геворгиз Р.Г., Щепачев С.Г., Король О.Н. Предельная оценка продуктивности микроводорослей в условиях естественного и искусственного освещения. *Экология моря*, 2010, спец. вып. 80, с. 29-33. [Gevorgiz R.G., Shchepachev S.G., Korol O.N. Limit assessment of microalgae productivity in conditions of natural and artificial illumination. *Ekologiya morya*, 2010, spec. release vol. 80, pp. 29-33. (In Russ.)]
7. Справочник по климату СССР. Вып. 10. Украинская ССР. Часть 1. Солнечная радиация, радиационный баланс и солнечное сияние. Л.: Гидрометиздат, 1966, 124 с. [Handbook on climate USSR. Issue 10. Ukrainian SSR. Part 1. Solar radiation, radiation balance and solar radiance. L.: Gidrometizdat, 1966, 124 p. (In Russ.)]
8. CdS Photoresistor Manual. GL125 Series Photoresistor. URL: <https://opencircuit.nl/ProductInfo/1000662/GL12528-Datasheet.pdf>.
9. Ефимова Т.В. Влияние спектрального состава света на содержание пигментов в клетках микроводорослей. *Морской экологический журнал*, 2011, отд. вып. № 2, с. 22-28. [Efimova T.V. Influence of the spectral composition of light on the content of pigments in microalgae cells. *Marine environmental journal*, 2011, no. 2, pp. 22-28. (In Russ.)]
10. Козел Н.В., Доманский В.П., Мананкина Е.Е., Адамчик К.О., Дремук И.А., Савина С.М. Влияние спектрального состава светодиодного излучения на структуру фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis*. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі*, 2015, № 2, с. 44-49. [Kozel N.P., Domanskij V.P., Manankina E.E., Adamchik K.O., Dremuk I.A., Savina S.M. Influence of the spectral composition of led radiation on the structure of photosynthetic apparatus *Spirulina platensis*. *Vesc. Nacyyanalnaj akadehm navuk Belarus*, 2015, no. 2, pp. 44-49. (In Russ.)]

11. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. *Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей*. Новосибирск: Наука, 1980, 136 с. [Belyanin V.N., Sid'ko F.Ya., Trenkenshu A.P. *Energy photosynthetic culture of microalgae*. Novosibirsk: Nauka, 1980, 136 p. (In Russ.)]
12. *Научно-прикладной справочник по климату СССР. Вып. 10. Украинская ССР. Серия 3. Части 1-6. Многолетние данные*. Л.: Гидрометиздат, 1988, 224 с. [Scientific and applied reference book on the climate of the USSR. Issue 10. Ukrainian SSR. Series 3. Parts 1-6. Multiyear data. L.: Gidrometizdat, 1988, 224 p. (In Russ.)]
13. Benavides A.M.S., Ranglová K., Malapascua J.R., Masojidek J., Torzillo G. Diurnal changes of photosynthesis and growth of *Arthrospira platensis* cultured in a thin-layer cascade and an open pond. *Algal Research*, 2017, vol. 28, pp. 48-56.

SEASONAL DYNAMICS OF LIMIT PRODUCTIVITY IN A HORIZONTAL PHOTOBIOREACTOR

Chekushkin A.A., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G.

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

Abstract. This paper presents data on the daily and seasonal changes in the inflow of solar radiation to the working surface of the photobioreactor. The results obtained correspond approximately to the reference data indicated in the literature for our geographical latitude for 1966 and 1988. Measurements were carried out from September 2019 to June 2020 inclusive on the basis of the Department of biotechnologies and phytoresources of the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol. A previously developed automatic light sensor based on an Arduino microcontroller was used as a measuring device. The main element of the sensor was a CdS photoresistor GL125. It is shown that the maximum absorption of the photoresistor is 593 nm, the sensitivity is 1.2 times higher than that of the luxmeter. To convert illumination units into irradiance, we used solar spectra at different heights above the horizon for the geographical latitude of Sevastopol. The average coefficient of conversion of klx in W/m^2 for the used photoresistor was 4.26. The amounts of energy photometric quantity of irradiance in the blue, green and red ranges of the solar spectrum were determined. For our conditions it is shown, that in winter the number of red rays in sunlight is 1.22 times higher, while in the blue part there is a decrease in light energy by 1.5 times. The average calorific value of 21 kJ/g and the photobiosynthesis efficiency of 5.58% were used to evaluate the limit productivity of microalgae culture. During the observation period, the minimum value of limit productivity was noted for December – 133 g/m², and the maximum for June – 824 g/m². The results obtained can be considered as a certain limit in the organization of industrial production of microalgae in the southern regions of Russia.

Key words: the spectrum of the sun, modeling, PAR, limit productivity, efficiency of photobiosynthesis.

ГЕНОМНЫЙ КАСКАД ПРОМОТОРОВ БАКТЕРИОФАГА T7: УЧАСТИЕ ВЫЗВАННОЙ СУПЕРСПИРАЛЬНОСТЬЮ ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ ДУПЛЕКСА ДНК (SIDD)

Орлов М.А., Дজেядин Т.Р., Сорокин А.А.

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

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: orlovmikhailanat@gmail.com

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. В данной работе рассмотрено значение вызванной суперспиральностью дестабилизации дуплекса ДНК (Stress-induced Duplex Destabilization, SIDD) промоторов бактериофага T7 в регуляции экспрессии его геномного каскада. Ранее для этого физического параметра ДНК показано участие в функционировании ряда областей геномной регуляции, включая промоторы T7. Действительно, исключительно короткие (~20 нуклеотидов) последовательности нативных промоторов T7 не могут объяснить высокоспецифичное настраиваемое (изменяется со сменой фаз жизненного цикла) связывание этих промоторов T7-РНК-полимеразой. Они слишком близки по последовательности - в ряде случаев и вовсе совпадающей. Естественно предполагать дополнительное участие другого типа кодирования такого молекулярного узнавания - физическими свойствами ДНК. Такие свойства напрямую определяют взаимодействия биомолекул и косвенно кодируются первичной структурой ДНК (что затрудняет их однозначное отнесение к фенотипу либо генотипу). Здесь мы применили расчет с последовательным изменением параметров (температура, ионная сила и суперспиральной плотности) профиля SIDD для всего генома бактериофага T7. Показано, что промоторные области более ранних областей геномного каскада более легкоплавки, что может служить для регуляции экспрессии генов и дифференциального узнавания разных промоторов.

Ключевые слова: геномика, физика ДНК, SIDD, промотор, бактериофаг T7.

Транскрипция прокариотических геномов (включая бактериофаги) сравнительно проста и служит хорошей моделью для изучения общих закономерностей. Как транскрипция, так и инициация - ее первая стадия - включают несколько этапов (посадка РНК-полимеразы на область промотора, формирование закрытого комплекса, его перевод в открытый и т.д.) Такие разнородные взаимодействия биологических макромолекул (включая молекулярное узнавание) не могут определяться только их пространственной структурой или аминокислотными/нуклеотидными последовательностями: существенна роль так называемого непрямого кодирования (“indirect readout”) за счет физических свойств участвующих молекул. Это определяет необходимость учета различных физических параметров дуплекса ДНК, которые могут иметь электростатическую, пространственную, термодинамическую и т.д. природу. Так, на этапе молекулярного узнавания до сближения РНК-полимеразы с ДНК их взаимодействия может определять только электростатический потенциал. Далее существенна их пространственная структура и способность к деформациям. На более поздних стадиях, при плавлении промоторной ДНК и переходом к открытому комплексу на первый план выходят термодинамические свойства дуплекса, в частности уровень суперспиральной дестабилизации при наложении суперспиральности (Stress-Induced Duplex Destabilization, SIDD). Неравнозначность отдельных параметров дуплекса характеризует и различные в функциональном отношении группы промоторов. Следует отдельно отметить теоретическое затруднение при отнесении физики дуплекса как признака генома к генотипу либо фенотипу. Подобные трудности связаны с тем, что с одной стороны, такие свойства ДНК обладают эволюционной и адаптивной значимостью. Как следствие, они могут быть отнесены к отбираемым в ходе эволюции признакам, т.е. фенотипу. С другой стороны, они определяются исключительно нуклеотидной последовательностью ДНК, подобно тому как это имеет место в случае кодирующих областей генов, т.е. генотипа [1].

Пара T7-РНК-полимераза/нативный промотор (узнаваемый ей, а не клеточной полимеразой сигма-70) представляет исключительно ценный объект исследования промоторно-полимеразного (и в целом молекулярного) узнавания в силу их малости, односубъединичности полимеразы, а также высокой специфичности и процессивности. В связи с данными качествами эта система нашла очень широкое применение в биотехнологии и геномной инженерии. Ранее нами показана значимость паттернов электростатических профилей (как первой дальнедействующей силы, определяющей взаимодействия РНК-полимеразы с ДНК) для дифференциального узнавания промоторов разных временных классов [2]. Такие паттерны характеризуют промоторы класса II и класса III, соответственно - общие для этих групп и сильно различаются у промоторов из разных групп. Такие профили соответствуют протяженности противоположно (положительно) заряженных участков поверхности полимеразы, что определяет их притяжение. Далее мы рассматривали SIDD, рассчитывая этот параметр по методике предложивших его авторов [3]. Для данного параметра показано участие в функционировании регуляторных областей разного типа, прежде всего - промоторов. Дестабилизация при

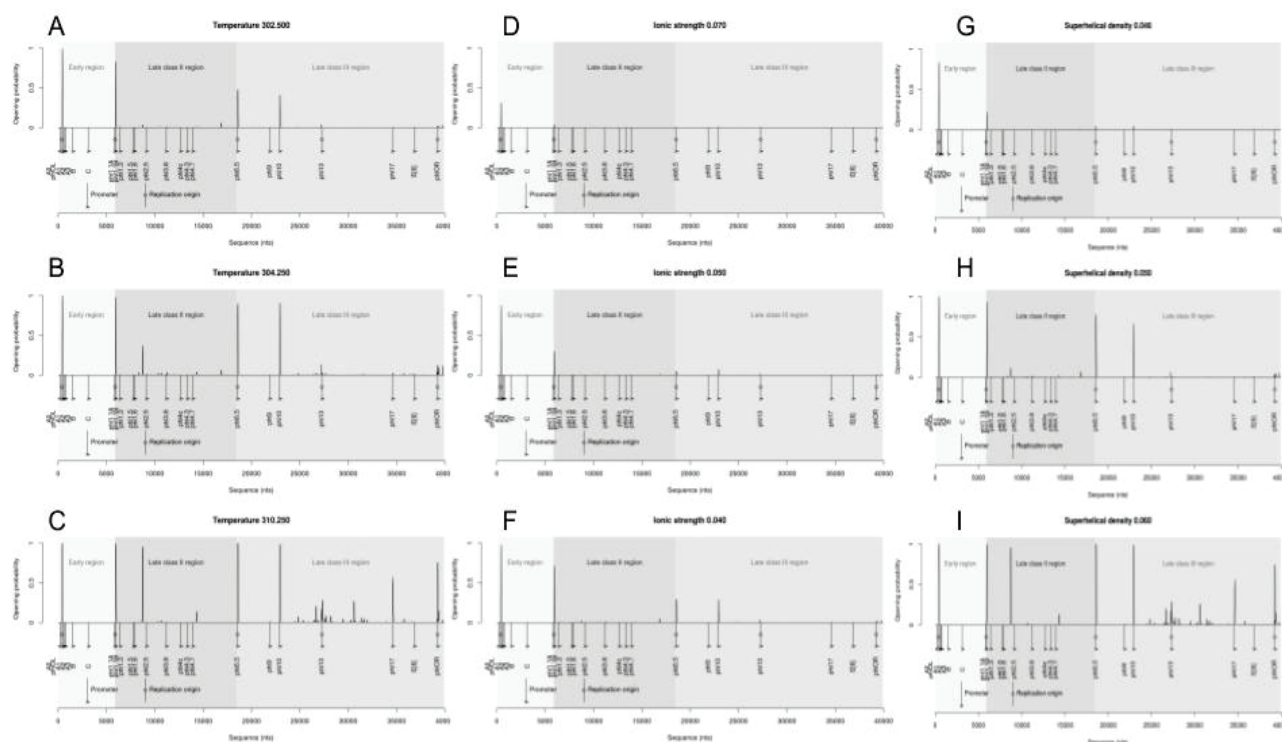


Рисунок 1. Профили SIDD для генома бактериофага Т7 с обозначением положения областей геномного каскада (ранняя, генов II класса и III класса - слева направо), локализации промоторов (стрелки) и их отношения к репликации (кружок означает участие промотора в данном процессе). Приведены профили для последовательно изменяющихся значений температуры (А-С), ионной силы раствора (D-F) и суперспиральной плотности (G-I)

суперспиральном стрессе (возникающем при посадке ДНК-связывающих белков) способствует облегчению плавления (т.е. открывания дуплекса) ДНК, что важно на более поздних этапах инициации транскрипции. Образующиеся одностранные участки и "пузыри транскрипции/репликации" позволяют белковой машинерии расположиться правильным образом, а транскрипции протекать с большей скоростью. При этом известно, что SIDD важен для активности части бактериальных промоторов и не вовлечен в работу других, т.е. служит для их функционального различия. Также этот параметр дуплекса успешно используется для автоматизированного предсказания положения промоторов [1, 3]. При этом нам удалось выявить значительное расхождение по уровню SIDD между классами II и III Т7-промоторов. Класс III характеризуется гораздо большей дестабилизацией, в то время как класс II труднее плавится. Мы полагаем, что это позволяет единственной РНК-полимеразе фага различать эти промоторы; кроме того, такое различие согласуется с их разными требованиями к внутриклеточной среде, в которой они могут быть активны (такие условия меняются с течением инфекции) [4]. Подобные данные позволяют различать те промоторы, которые имеют дополнительную функцию ориджина репликации - они дестабилизированы сильнее [5].

В данной работе рассчитаны полногеномные профили SIDD (Stress-induced Duplex Destabilization) для бактериофага Т7 с пошаговым изменением параметров расчета. Температура, ионная сила и суперспиральная плотность (характеризует число самопересечений спирали) последовательно увеличивались либо уменьшались таким образом, чтобы увеличить механический стресс на ДНК. В результате установлена заметная склонность более ранних областей плавиться раньше. В соответствии с нашими предыдущими работами, промоторы, выполняющие дополнительную функцию ориджинов репликации характеризуются более лёгким плавлением (Рисунок 1). Последнее существенно для этого паразитического генома, требующего активной репликации с одновременным участием многих точек репликации. Таким образом, выявлена четкая связь геномных координат, как следствие, функциональной роли и времени активности в жизненном цикле для нативных промоторов Т7 и склонности к дестабилизации под воздействием суперспиральности. Данное наблюдение наряду с характерными паттернами электростатического потенциала, выявленными ранее в наших работах, свидетельствуют о важности физики ДНК для дифференциального распознавания промоторов данного генома. Действительно, очень малые размеры последовательностей нативных промоторов Т7 на фоне очень близкой или даже идентичной нуклеотидной последовательности предполагает, что одной первичной структуры недостаточно для высокоспецифичной и оперативно переключаемой регуляции. Данные наблюдения целесообразно учитывать при получении рекомбинантных ДНК на основе промотора Т7, т.к. изменение нуклеотидной последовательности (не только самого промотора, но также очень удаленных фланкирующих областей) могут резко изменить профили SIDD и, как следствие, уровень промоторной активности.

Список литературы / References:

1. Ryasik A., Orlov M., Zyкова E., Ermak T., Sorokin A. Bacterial promoter prediction: Selection of dynamic and static physical properties of DNA for reliable sequence classification. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2018, vol. 16(1), p. 1840003. DOI: 10.1142/s0219720018400036.
2. Сорокин А.А., Дзелядин Т.Р., Орлов М.А., Зыкова Е.А., Камзолова С.Г. Пространственная организация электростатических взаимодействий Т7 РНК-полимеразы с поздними промоторами Т7 ДНК. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им Ю.А. Овчинникова*, 2016, т. 12, № 4, с. 64-71. [Sorokin A.A., Dzhelyadin T.R., Orlov M.A., Zyкова E.A., Kamzolova S.G. Prostranstvennaya organizaciya elektrostatičeskikh vzaimodejstvij T7 RNK-polimerazy s pozdnimi promotorami T7 DNK. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoj biologii im YU. A. Ovchinnikova*, 2016, vol. 12, no. 4, pp. 64-71. (In Russ.)]
3. Zhabinskaya D., Madden S., Benham C.J. SIST: stress-induced structural transitions in superhelical DNA. *Bioinformatics*, 2014, vol. 31 (3), 421-422. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu657.
4. Орлов М.А., Камзолова С.Г., Рясик А.А., Зыкова Е.А., Сорокин А.А. Профили вызванной суперспирализацией дестабилизации дуплекса ДНК (SIDD) для промоторов бактериофага Т7. *Компьютерные исследования и моделирование*, 2018, т. 10, № 6, с. 867-878. [Orlov M.A., Kamzolova S.G., Ryasik A.A., Zyкова E.A., Sorokin A.A. Profili vyzvannoj superspiralizaciej destabilizacii dupleksa DNK (SIDD) dlya promotorov bakteriofaga T7. *Kompyuternye issledovaniya i modelirovanie*, 2018, vol. 10, no. 6, pp. 867-878. (In Russ.)]
5. Orlov M.A., Ryasik A.A., Sorokin A.A. Destabilization of the DNA Duplex of Actively Replicating Promoters of T7-Like Bacteriophages. *Molecular Biology*, 2018, vol. 52(5), pp. 686-692. DOI: 10.1134/s0026893318050114.
6. Orlov M.A., Sorokin A.A. DNA sequence, physics, and promoter function: Analysis of high-throughput data On T7 promoter variants activity. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2020, vol. 18 (2), p. 2040001. DOI: 10.1142/s0219720020400016.

GENOME CASCADE OF T7 BACTERIOPHAGE: STRESS-INDUCED DUPLEX DESTABILIZATION IMPLICATION (SIDD)

Orlov M.A., Dzhelyadin T.R., Sorokin. A.A.

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

3 Institutskaya str, Poushchino, 142290, Russia; e-mail: orlovmikhailanat@gmail.com

Abstract. Here we address Stress-Induced DNA Duplex Destabilization (SIDD) for T7 bacteriophage promoters genome cascade regulation. Earlier the DNA parameter was shown to affect functioning several kinds of regulatory regions including T7 promoters. Indeed, this rather short (ca. 20 nucleotides) sequences of native promoters in T7 genome cannot explain how exactly they are recognised by T7-RNA-polymerase in a highly specific and adjustable manner. They are not long enough and similar in sequence - that sometimes even shared. Reasonable explanation here is that some additional kind of coding, e.g. by DNA physical properties. These govern biomolecular interaction directly while also encoded by DNA primary sequence – fact posing question whether they are phenotype or genotype. Here we calculated whole-genome profiles for T7 bacteriophage with gradually changing parameters (temperature, ionic strength, and superhelical density). As a result we see that early regions of the genome are destabilized more easily which might be involved in regulation of gene expression as well as differential recognition of promoters.

Key words: genomics, DNA physics, SIDD, promoter, bacteriophage T7.

ВИЗУАЛЬНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК ВОДНЫХ КЛАСТЕРНЫХ СТРУКТУР, НАХОДЯЩИХСЯ ВО ВНУТРЕННЕЙ ПОЛОСТИ D-FF НАНОТРУБОК

Филиппов С.В., Лихачёв И.В., Быстров В.С.

ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН

ул. проф. Виткевича, 1, г. Пушкино, 142290, РФ; e-mail: fsv141@mail.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2020

Аннотация. Для изучения структурных особенностей водных кластерных структур (ВКС), обнаруживаемых в ходе исследований самоорганизации дифенилаланиновых (FF) пептидных нанотрубок (L- и D- хиральностей) внутри их полостей, было выполнено 3D-моделирование D-FF нанотрубок, содержащих в полости канала воду. Моделирование указало оптимальное количество молекул водного кластера на одну элементарную ячейку (два витка спирального участка), равное 21 молекуле воды. Для лучшего понимания характера структурных перестроек ВКС, происходящих во внутренней полости канала D-FF в ходе оптимизации, был применён разработанный нами метод визуально-дифференциального анализа конформационных изменений биологических макромолекул. Были получены идентифицирующие (ID) и «гипсометрические» проекции: внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT, проекции внутренней поверхности канала D-FF PNT. Анализ ID-проекций водных кластеров в исходном и оптимизированном состояниях выявил небольшое изменение (+0,568%) доступной поверхности атомов кислорода и атомов водорода (-0,68%). Визуальный анализ ID-проекций показал заметные структурные перестройки структур кластера воды. Для их описания из трёх «гипсометрических карт» были составлены композиционные «топографические карты» и гибридные (2D/3D) модели, показывающие области, с большой вероятностью участвующие в формировании стабильных водородных связей, и характер изменений структур кластера воды.

Ключевые слова: пептидные нанотрубки, ПНТ, PNT, дифенилаланин, ФФ-НТ, FF, визуально-дифференциальный, 3D, гипсометрический, проекция, модель, Blender, PhotoReactor, G'MIC.

Пептидные нанотрубки благодаря присущему им широкому спектру уникальных свойств, важных для различных применений в нанoeлектронике, биомедицине, нанотехнологиях, являются объектом всесторонних исследований. Одним из ключевых свойств этих структур, без сомнения, является самоорганизация и самосборка дифенилаланиновых (FF) пептидных нанотрубок (ПНТ/PNT). В ходе исследований этих свойств FF PNT (L- и D-хиральностей) было показано, что во внутренней гидрофильной полости таких нанотрубок находится вода [1]. Однако её наличие трудно показать с достаточной достоверностью, поскольку рентгеновские методы исследований уверенно не обнаруживают атомы водорода [2].

Таким образом, для того чтобы получить информацию о структурных особенностях водных кластерных структур внутри полостей FF-нанотрубок, было предпринято численное моделирование D-FF PNT, содержащих в полости канала воду [1]. Данное моделирование позволило установить оптимальное количество молекул водного кластера на одну элементарную ячейку (или два витка спирального участка) и оказалось равным 21 молекуле воды [1].

Для более подробного изучения характера структурных перестроек водных кластерных структур, происходящих во внутренней полости канала D-FF в ходе оптимизации, был применён разработанный нами ранее метод визуально-дифференциального анализа конформационных изменений биологических макромолекул [3].

Исходные данные в PDB-формате были получены путём конвертации HyperChem HIN-файлов программным пакетом Open Babel v.3.1.1 [4]. Ввиду того, что в работах различных исследователей встречаются разночтения в обозначениях атомов и атомных групп [5], на рисунке 1 приведены обозначения некоторых атомов дифенилаланина, использованные в наших PDB-файлах.

В рамках выбранного нами метода анализа в среде свободного 3D-редактора Blender v.2.79b [6] были получены простые цилиндрические проекции [7, 8] – идентифицирующие (ID) [9], представленные на рисунке 2, и «гипсометрические» [10], показанные на рисунке 3. Данные проекции являются своеобразными картами структурных особенностей внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT в исходном (Init) и оптимизированном (Opt) состояниях, а также картами, отображающими на плоскости структурные особенности внутренней поверхности канала D-FF PNT.

ID-поверхности исходного и оптимизированного водных кластеров были сегментированы и проанализированы [3] в программных пакетах ImageJ [11] и PhotoReactor v.1.9U Beta [12] с результатом, представленным в таблице 1, свидетельствующим о малом положительном изменении (+0,568%) доступной поверхности атомов кислорода и небольшом отрицательном изменении доступной поверхности атомов водорода (-0,68%).

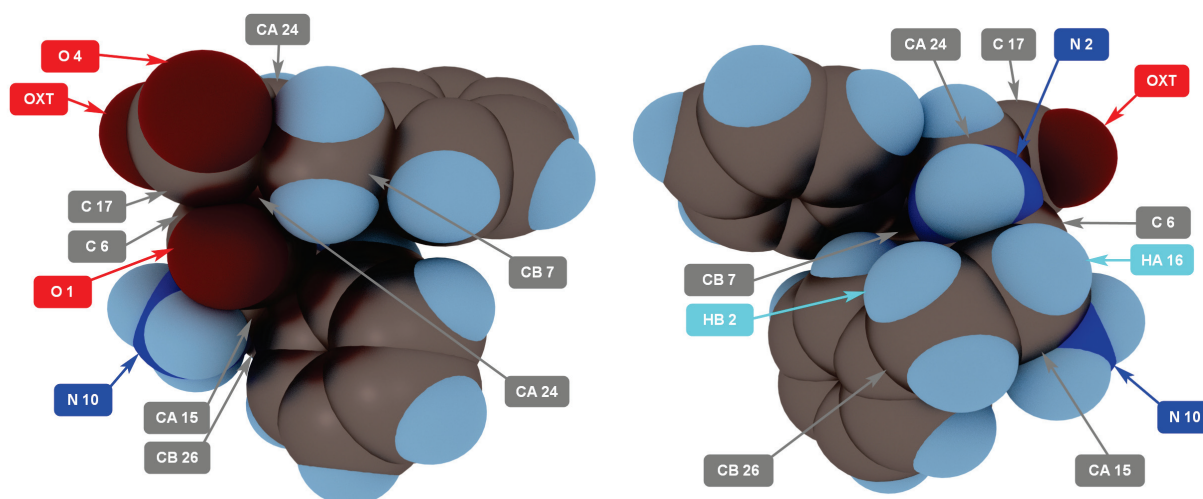


Рисунок 1. Обозначения основных атомов, использованные в PDB-файлах, показанные на 3D-модели молекулы дифенилаланина. Модель представлена с двух противоположных сторон

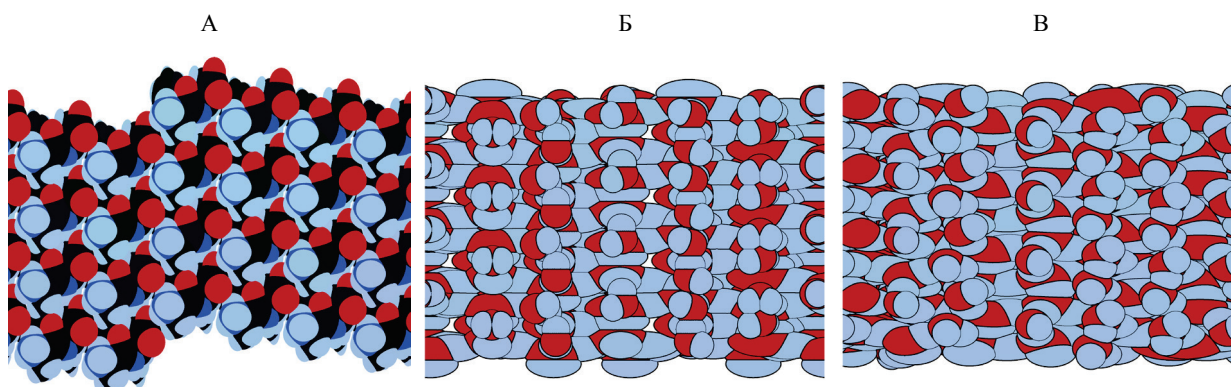


Рисунок 2. Идентифицирующие (ID) проекции: внутренней поверхности канала D-FF PNT (А), внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT в исходном (Init) состоянии (Б), внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT в оптимизированном (Opt) состоянии (В). Различные цвета обозначают (и идентифицируют в PDB-файле) атомы определённых типов: голубой – атомы водорода, красный – кислорода, синий – азота, черный – углерода

При этом нельзя не отметить пусть и небольшой, но вполне заметный (12,844%) рост количества проекций атомов кислорода, который может говорить об увеличивающемся в процессе оптимизации числе водородных связей во внутренней полости PNT и своеобразной более плотной интеграции ВКС в полость D-FF PNT. Косвенно об этом может свидетельствовать и полное закрытие всех промежутков между молекулами воды (рис. 2В). В исходной конфигурации ВКС их число равняется восьми, а площадь составляет около 0,7% от всей площади «карты» (рис. 2Б). В оптимизированной их нет совсем.

Таблица 1. Количественные изменения в ID-проекциях атомов кислорода внешней поверхности водных кластерных структур до и после оптимизации

Внешняя проекция ВКС:	Кол-во зон (проекций атомов кислорода)	Площадь проекций атомов кислорода, пикс ²	Площадь проекций атомов кислорода, %*
Исходного	109	1071604	22.71
Оптимизированного	123	1098416	23.278

*) Примечание: общая площадь «карты» (проекция) — 4 718 592 пикс²

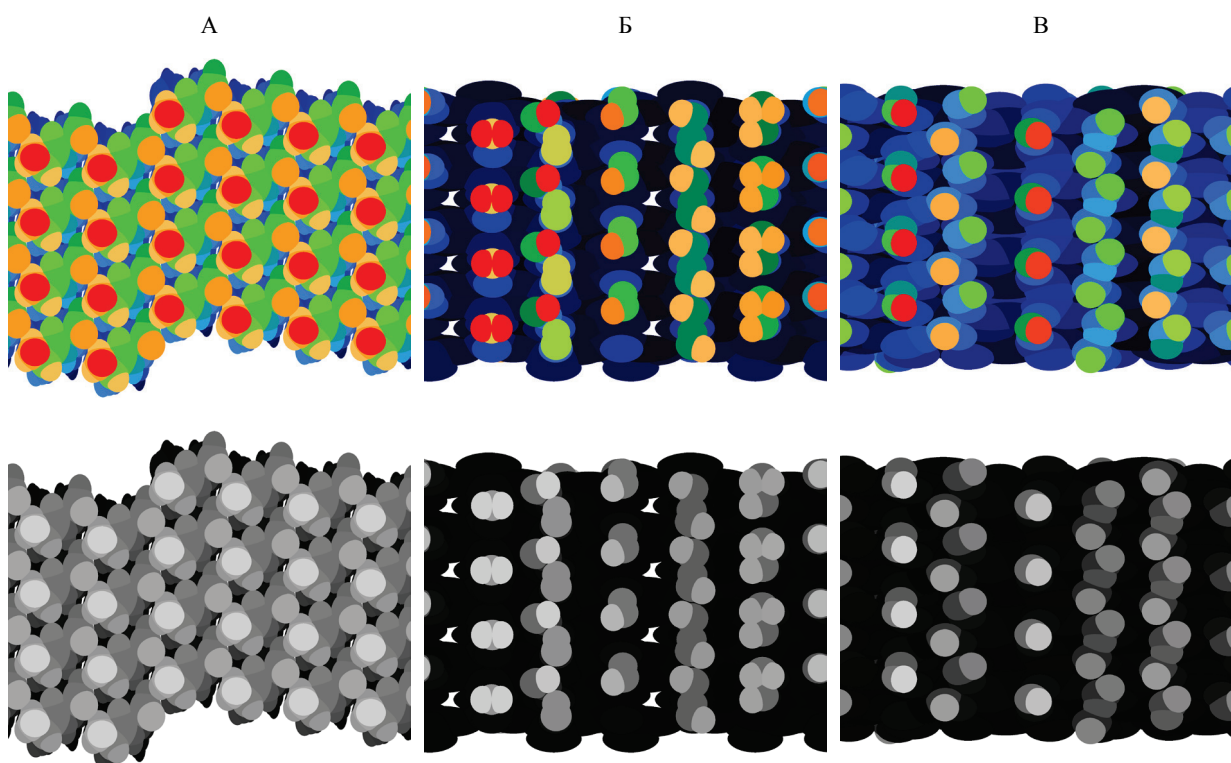


Рисунок 3. «Гипсометрические» проекции в цветном (вверху) и монохромном (внизу) представлениях: внутренней поверхности канала D-FF PNT (А), внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT в Init-состоянии (Б), внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT в Opt-состоянии (В)

Визуальный анализ вышеприведённых ID-проекций подтверждает предположение о заметных структурных перестройках структур водных кластеров, происходящих в процессе оптимизации. Но для их обоснования или опровержения, а также для определения характера этих перестроек, мы выполнили «дифференциальную» часть анализа – сравнение ID-проекций до оптимизации и после. Это сравнение было выполнено в среде узлового (nodal) графического редактора PhotoReactor [12]. Чтобы обеспечить надёжность сравнения, на встроенном в редактор скриптовом языке был написан программный модуль, выполняющий строгое покомпонентное (RGB) сравнение «параллельных» пикселей двух ID-карт (рис. 4А).

Несложно заметить, что большая часть «дифференциальной карты» окрашена белым цветом, что соответствует областям, которые у исходной и оптимизированной карт заняты проекциями разных атомов. Иными словами, белые участки обозначают своего рода динамичные зоны и свидетельствуют о глубоких структурных перестройках, происходящих на внешней поверхности ВКС. Немногочисленные цветные «лоскуты» показывают консервативные области, в которых позиция соответствующих им атомов не изменялась в процессе оптимизации.



Рисунок 4. Узловая сеть (А) с модулем покомпонентного сравнения (жёлтый прямоугольник) и сегмент результирующей карты (Б), представляющий результат работы сети. На вход сравнивающего узла (обозначен «C++») подаются две «параллельные» ID-проекции — исходная и оптимизированная. Если значения пикселей, идентифицирующих атом на проекции, одинаковы, то такие значения поступают на выход и далее сохраняются в графическом файле (модуль Output). В противном случае пиксель закрашивается белым цветом. Сегмент результирующей «карты» (Б) приблизительно соответствует проекции внутренней поверхности одного витка D-FF PNT. Цвета на данной карте обозначают атомы ВКС — водорода (голубой) и кислорода (красный)

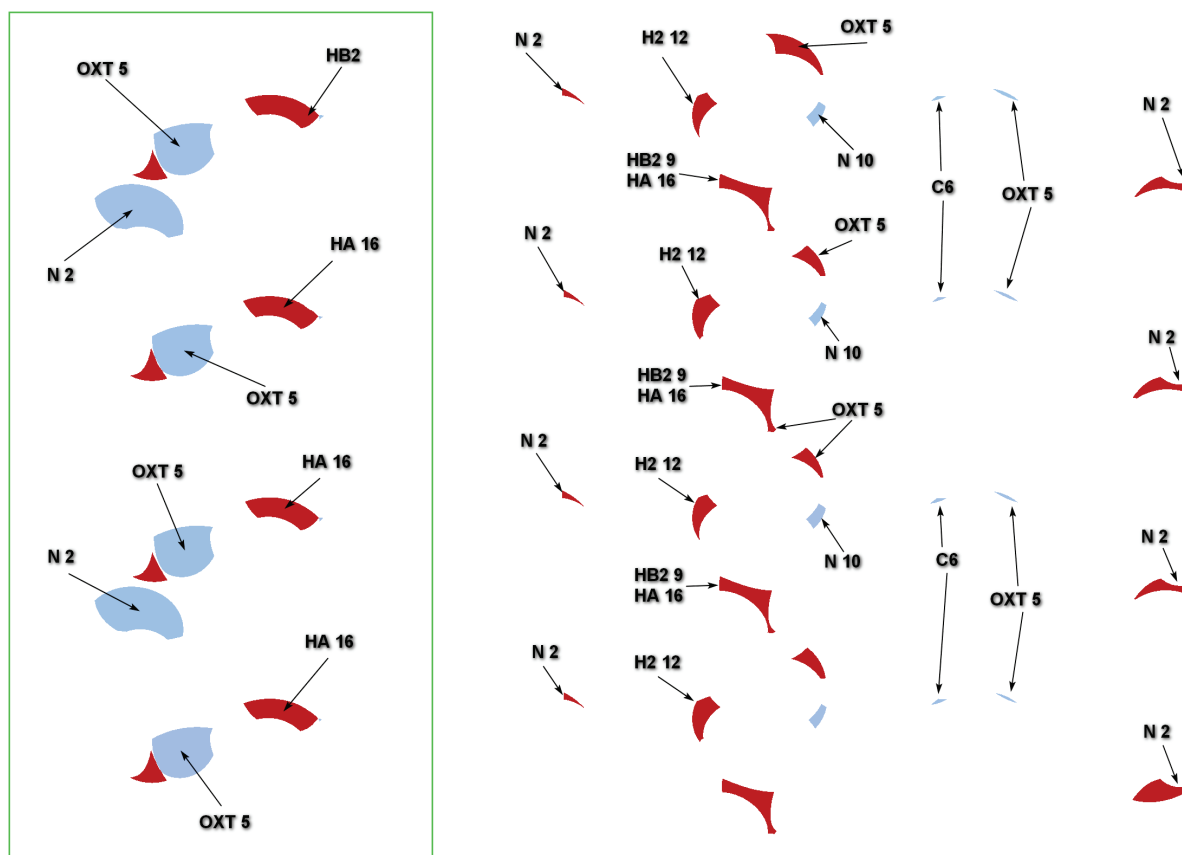


Рисунок 5. Идентификация консервативных (с точки зрения структурных перестроек ВКС) зон на внутренней поверхности канала D-FF. Зелёным прямоугольником обведена область с наиболее широкими по площади «консервативными» зонами

В рамках нашего метода мы имеем возможность комбинировать любые карты в любых сочетаниях. Так, например, мы можем совместить «дифференциальную карту» ВКС с ID-картой D-FF и таким образом идентифицировать [9] те атомы на внутренней поверхности PNT, в районе которых нет структурных перестроек ВКС, что и показано на рисунке 5.

Несмотря на то, что структура внутренней поверхности D-FF упорядочена и однородна (рис. 2А, 3А), «дифференциальная карта» такой характеристикой явно не обладает, хотя и демонстрирует явные признаки упорядоченности. Совершенно очевидно, что наиболее широкие по площади консервативные зоны локализованы преимущественно в районе только одной из шести молекул D-FF в витке PNT. И, более того, эти зоны располагаются одна над другой (обведено зелёным прямоугольником на рисунке 5). То есть соответствуют одним и тем же молекулам D-FF в каждом витке PNT.

Нельзя не отметить и то, что широкие голубые (соответствующие водородам ВКС) участки проекции на поверхности D-FF противостоят гидрофильным атомам азота (N2) и кислорода (OXT), а широкие красные (соответствующие кислородам ВКС) участки проекции противостоят на поверхности D-FF атомам водорода (HA16). То есть можно сделать вывод о том, что уже на стадии «гексагонального льда» водный кластер формирует устойчивые водородные связи в одном и том же постоянном месте витка D-FF. Эти связи «привязывают» его к поверхности PNT. Причём только с одной стороны.

На данном этапе сложно сказать, будет ли наблюдаться такое же поведение ВКС *in-vitro* у пептидных нанотрубок в водной среде. Но, безусловно, данное предположение необходимо проверить с помощью других методов теоретических исследований, например, методов молекулярной динамики.

Для более детального описания конформационных перестроек ВКС, происходящих в процессе оптимизации, нами был создан ряд *сравнительных композиционных проекций*, объединяющих «гипсометрические» и ID-карты, как на плоскости, так и на поверхности 3D-рельефа. При этом «гипсометрические» проекции были преобразованы в карты топографического вида (рис. 6), которые содержат меньше мелких и второстепенных деталей и удобней для восприятия. Данная процедура выполнялась при помощи функции **topographic_map** программного пакета G'MIC [13].

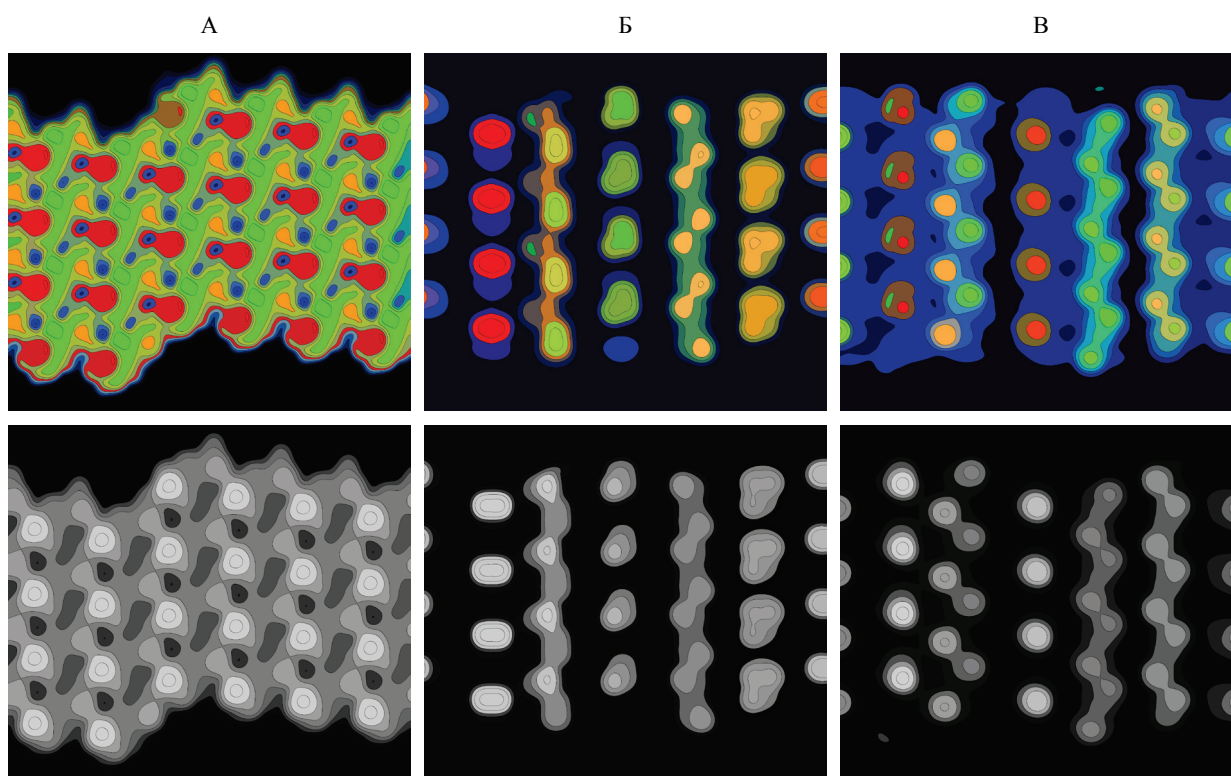


Рисунок 6. «Гипсометрические» проекции топографического вида в цветном (вверху) и монохромном (внизу) представлениях: внутренней поверхности канала D-FF PNT (А), внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT в Init-состоянии (Б), внешней поверхности водных кластерных структур, расположенных внутри D-FF PNT в Opt-состоянии (В)

Полученные карты рельефа поверхностей ВКС и D-FF были использованы для подготовки комбинированных изображений, выступивших в роли текстур для 3D-модели рельефа. Модель развёрнутого на плоскость рельефа, в свою очередь, также была построена с использованием монохромных «гипсометрических» проекций картографического вида (рис. 6).

Композиция выполнялась в среде PhotoReactor [12] при помощи двух узловых сетей, представленных на рисунке 7. Построение рельефа, его текстурирование и визуализация — в программном пакете Blender v.2.83.2 LTS [6].

Как и ожидалось, комбинирование 3D-рельефа с соответствующей ему композиционной картой (рис. 8), отчётливо демонстрирует структурные изменения, происходящие с ВКС в процессе оптимизации. Во-первых, оптимизированный рельеф (рис. 6В и 8Б) имеет меньшую амплитуду в сравнении с амплитудой ВКС в исходном состоянии (рис. 6Б и 8А). Во-вторых, в процессе оптимизации меняется тип атомов, контактирующих с внутренней поверхностью канала D-FF PNT. Если в исходном состоянии на выступающих частях рельефа внешней поверхности ВКС присутствуют атомы кислорода, то после оптимизации, судя по всему, молекулы воды разворачиваются таким образом, чтобы наружная поверхность ВКС в наиболее выступающей в сторону D-FF части была сформирована преимущественно атомами водорода. И это, как было показано выше (табл. 1), без значительного изменения площади атомов кислорода, но с некоторым ростом числа их проекций.

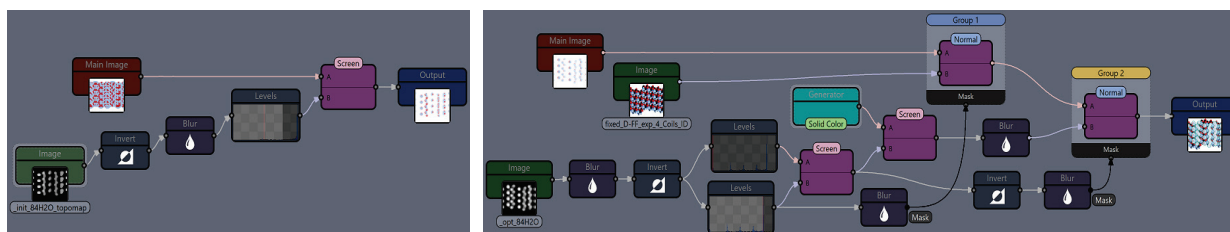


Рисунок 7. Узловые сети для создания текстур, представляющих необходимую информацию в зонах особого внимания

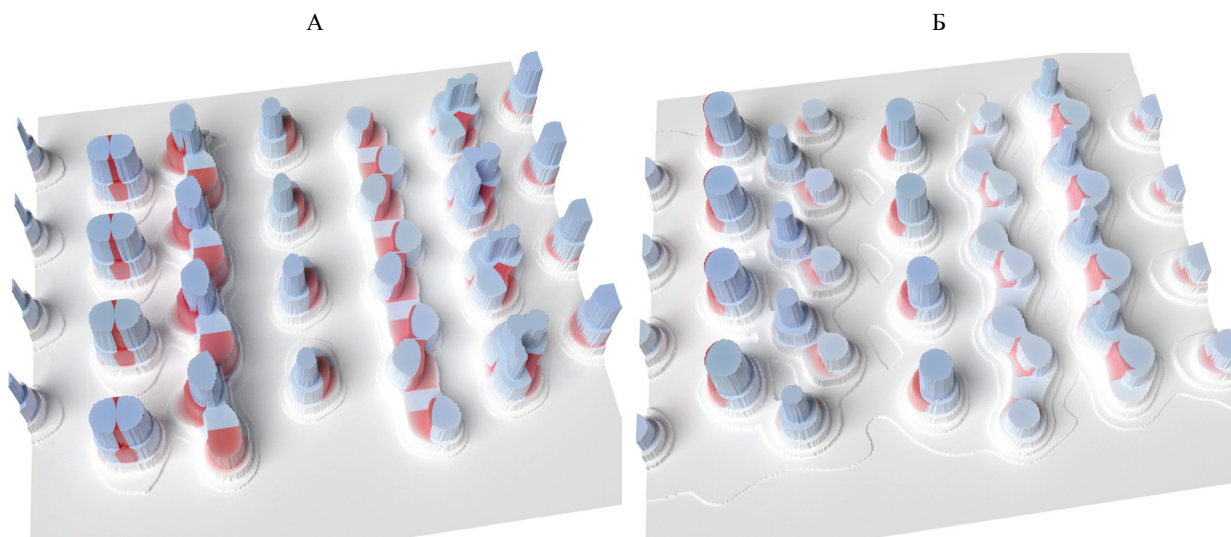


Рисунок 8. 3D-визуализация рельефа внешней поверхности ВКС с демонстрацией типов атомов на выступающих в сторону внутренней поверхности D-FF участках: в исходном состоянии (А) и после оптимизации (Б)

Однако для того чтобы детально проанализировать характер взаимодействия внутренней поверхности канала D-FF PNT с внешней поверхностью водных кластерных структур, вышеприведённых карт явно недостаточно. В качестве первого приближения к оценке таких взаимодействий был создан ряд гибридных (2D/3D) моделей, в которых идентификационная и «гипсометрическая» проекции водных кластеров после оптимизации были размещены на поверхности рельефа D-FF в виде текстур (рис. 9Б, 9В).

Рельеф внутренней поверхности D-FF PNT для этих моделей был также сформирован из монохромных «гипсометрических» карт в среде 3D-редактора Blender [6]. В виду своей статичности, согласно условиям задачи по оптимизации ВКС, рельеф D-FF выступил в роли виртуальной формовой матрицы, на которую мы получили возможность накладывать имеющиеся у нас структурные (ID) и «гипсометрические» карты, получая в некотором роде уникальные по своей информативности композиционные модели (рис. 9).

Модель, у которой на рельеф D-FF наложена идентификационная карта (рис. 9А), служит своеобразной референс-моделью. Её можно использовать для нахождения соответствия между рельефными участками D-FF других моделей и атомами на внутренней поверхности D-FF.

Модель, представленная на рисунке 9Б, показывает совмещённое с рельефом расположение участков, консервативных с точки зрения динамики, и, возможно, мест локализации стабильных водородных связей между структурами водного кластера и атомами внутренней поверхности D-FF PNT. Также эта модель указывает на атомы, образующие водородные связи, и вместе с референс-моделью (рис. 9А) характеризует сопутствующее им окружение.

Наибольший интерес представляет модель, в которой на объёмной поверхности D-FF размещена цветная «гипсометрическая» карта (рис. 9В). Эта модель позволяет сделать выводы о взаиморасположении атомов ВКС и внутренней поверхности D-FF, подтверждая ряд вышеприведённых выводов и дополняя их.

Так, например, эта модель показывает, что наиболее «притягательными» для атомов ВКС являются участки, образованные проекциями атомов N2 и ОХТ (рис. 10). Причём самые «высокие» области «гипсометрической» карты ВКС (отмечены красным цветом) противолежат атомам N2 D-FF PNT (рис. 9В).

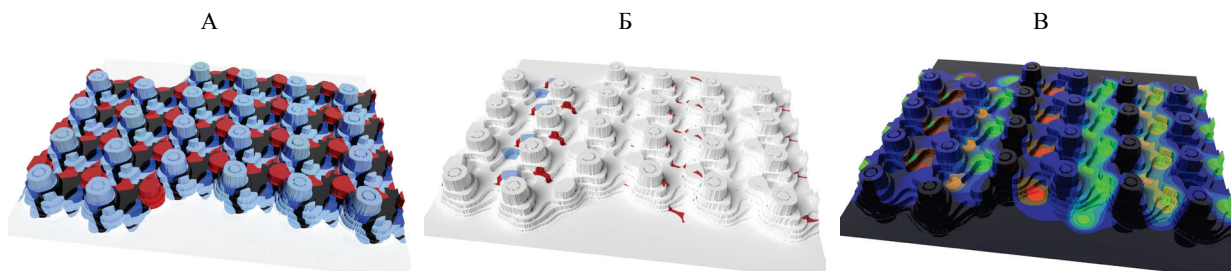


Рисунок 9. Проекция, наложенные на рельеф внутренней поверхности D-FF в виде текстур: идентифицирующая атомы D-FF проекция (А), карта консервативных участков ВКС (Б), «гипсометрическая» карта оптимизированных ВКС (В)

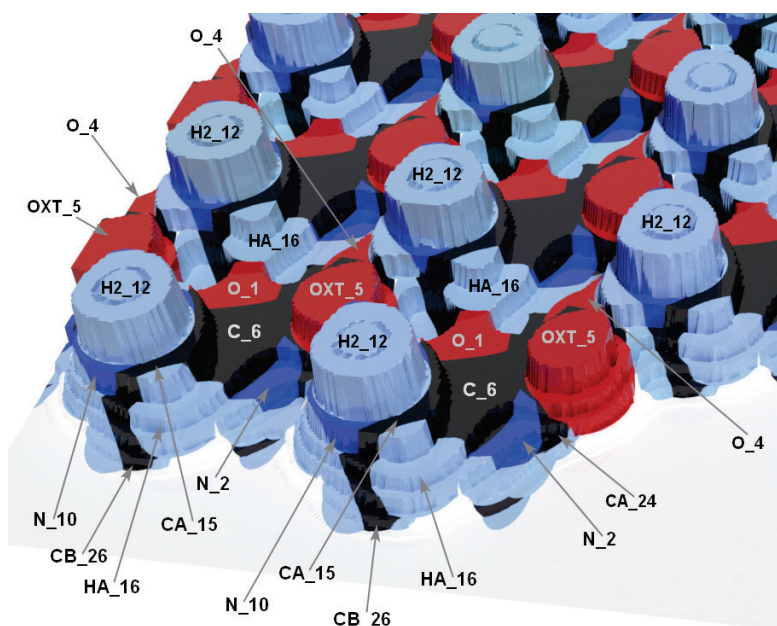


Рисунок 10. PDB-идентификаторы атомов внешней поверхности D-FF, отмеченные на фрагменте соответствующей 3D-модели рельефа, с наложенной на него ID-проекцией

Если смотреть на модель рельефа D-FF с «гипсометрической» проекцией (рис. 9В) слева направо, то обращает на себя внимание периодичность и чередующийся характер рельефных выступов ВКС, проникающих в углубления внутренней поверхности D-FF, напоминающий зубчатое зацепление, но с неодинаковым шагом. Если в условно первом вертикальном жёлобе D-FF «зацепление» с атомами ВКС осуществляется через атомы N2 и OXT, то в следующем жёлобе «зацепление» происходит преимущественно в области расположения атомов O1 и в меньшей степени – HA16. Далее преимущество имеют опять области напротив атомов N2 и OXT, а в следующем – O1 и так далее. При этом по мере удаления от желоба с максимальной глубиной «зацепления», в следующих желобах уменьшается его глубина и изменяется баланс влияния на атомы ВКС условных групп атомов – N2-OXT и O1.

Всё вышесказанное подтверждает и рисунок 11. Представленная на нём торцевая Z-проекция соответствует молекулярным моделям, полученным в работе, посвящённой моделированию и исследованию физических свойств дифенилаланиновых нанотрубок, содержащих в своей полости молекулы воды [1].

Примечательно, что консервативные области ВКС (рис. 5 и рис. 9Б) совпадают с областями максимального зацепления.

И, наконец, представленные на рисунке 12 модели позволяют рассмотреть взаимодействие ВКС с внутренней структурой D-FF с позиции водных кластерных структур. Эти модели совмещают в себе обращённый (инвертированный) 3D-рельеф оптимизированной ВКС, на выступающие в сторону D-FF области которого нанесена идентифицирующая атомы окраска. Нанесённые на плоские участки рельефа «гипсометрические» (рис. 12А) и идентификационные (рис. 12Б) карты позволяют видеть как рельефные структуры обращённой к D-FF поверхности (рис. 12А), так и их атомный состав (рис. 12Б).

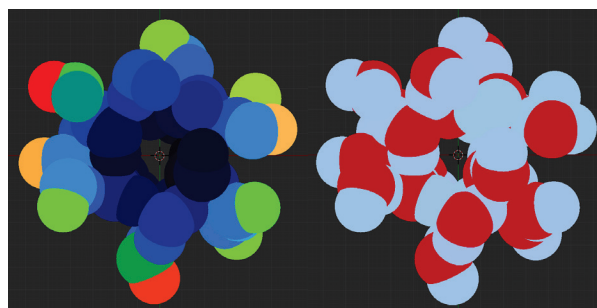


Рисунок 11. Вид на торцевую часть структуры водного кластера в видовом окне Blender. Слева – «гипсометрическая» окраска – синий цвет обозначает удалённость атомов от внешней поверхности ВКС, красный – близость к нему. Справа – идентификационная окраска. Голубые оттенки обозначают атомы водорода, красные – кислорода. Через центр координат, отмеченный бело-красной окружностью, проходит ось пептидной нанотрубки

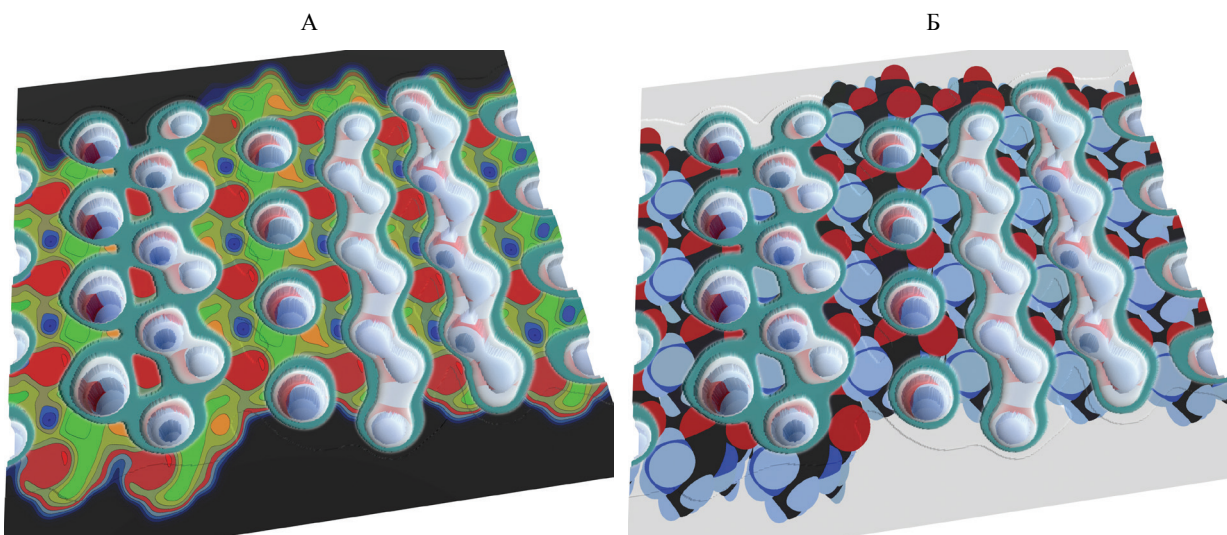


Рисунок 12. Модель, совмещающая 3D-рельеф оптимизированной ВКС, идентификацию атомов ВКС на выступающих в сторону D-FF областях и «гипсометрическую» карту D-FF (А), идентификационную карту D-FF (Б). Бирюзовым цветом проведено визуальное разделение проекций D-FF и ВКС

Визуальный анализ вышеприведённых моделей подтверждает все описанные ранее наблюдения относительно «геометрии укладки» двух поверхностей и взаиморасположения атомов контактирующих поверхностей D-FF и оптимизированных водных кластерных структур.

Заключение.

Комплекс вышеописанных моделей, построенных в рамках данной работы, позволил детально проанализировать характер и структуру взаиморасположения атомов двух контактных поверхностей — D-FF и ВКС.

На созданных композиционных картах и гибридных моделях посредством сравнительной композиции проекций были показаны области, с большой вероятностью участвующие в формировании водородных связей, стабильных на протяжении всего цикла оптимизации.

Был показан характер трансформаций в структуре кластера воды, заключающийся в изменении его геометрических параметров – уменьшении амплитуды рельефных выступов внешней поверхности ВКС и деформации имеющих форму цилиндра водных кластерных структур.

Показано изменение состава атомных групп, контактирующих с D-FF поверхностью, при незначительном изменении площади их проекций, которые с рядом ограничений можно рассматривать как аналог доступных поверхностей.

Сформулированы задачи для дополнительных исследований другими методами моделирования и теоретического конформационного анализа.

Ту часть визуально-дифференциального анализа, где он указывает на очевидные факты и следствия, мы рассматриваем как подтверждение состоятельности применённых нами методов моделирования и интерпретации полученных на наших моделях данных.

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. 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. - в печати
2. Kim J., Han T.E., Kim Y. et al. Role of Water in Directing Diphenylalanine Assembly into Nanotubes and Nanowires. *Adv. Mater.*, 2010, vol. 22, pp. 583-587.
3. 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. *Biofizika*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 445-452. (In Russ.)]
4. O'Boyle N.M., Banck M., James C.A. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*, 2011, vol. 3, no. 33. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33.

5. Иванов А.О., Мищенко А.С., Тужилин А.А. Геометрия аминокислот и полипептидов. *Наноструктуры. Математическая физика и моделирование*, 2014, т. 10, № 1, 49-76. [Ivanov A.O., Mishchenko A.S., Tuzhilin A.A. Geometry of amino acids and polypeptides. *Nanostructures. Mathematical physics and modelling*, 2014, vol. 10, № 1, 49-76. (In Russ.)]
6. Blender. Сайт программы 3D моделирования, анимации и рендеринга. [Электрон. ресурс]. URL: <https://www.blender.org> (дата обращения: 01.07.2020) [Blender. Website of 3D modeling, animation and rendering program]
7. Филиппов С.В. Программная платформа Blender как среда моделирования объектов и процессов естественно-научных дисциплин (Препринт № 230, ИПМ им. М.В. Келдыша, 2018). DOI: 10.20948/prepr-2018-230. URL: http://keldysh.ru/papers/2018/prep2018_230.pdf [Filippov S.V. *Blender software platform as an environment for modeling objects and processes of science disciplines* (Keldysh Institute Preprints. Preprint N 230, 2018). (In Russ.)]
8. Филиппов С.В., Сивожелезов В.С. Метод построения динамических молекулярных моделей в среде открытой 3D-платформы Blender на примере β 2-адренорецептора. Доклады Международной конференции "Математическая биология и биоинформатика". Под ред. В.Д. Лахно. Пушкино: ИМПБ РАН, 2018, т. 7, № е45. DOI: 10.17537/icmbb18.23. [Filippov S.V., Sivozhelezov V.S. *Method of constructing dynamic molecular models within the environment of the Blender open 3D platform exemplified by β 2-adrenergic receptor*. Proceedings of the International Conference "Mathematical Biology and Bioinformatics". Ed. V.D. Lakhno. Pushchino: IMPB RAS, 2018, vol. 7, no. e45. DOI: 10.17537/icmbb18.23. (In Russ.)]
9. Филиппов С.В. Метод идентификации атомов макромолекул, визуализируемых в 3D редакторах (Препринты № 97, ИПМ им. М.В. Келдыша, 2019). DOI: 10.20948/prepr-2019-97. URL: https://keldysh.ru/papers/2019/prep2019_97.pdf [Filippov S.V. *Method for the identification of atoms of macromolecules visualized in 3D editors*. Keldysh Institute Preprints. Preprint no. 97, 2019. (In Russ.)]
10. Филиппов С.В., Полозов Р.В., Сивожелезов В.С. Визуализация пространственных структур (био)макромолекул в виде подобных гипсометрическим карт (Препринт № 61, ИПМ им. М.В. Келдыша, М., 2019). DOI: 10.20948/prepr-2019-61. URL: https://keldysh.ru/papers/2019/prep2019_61.pdf [Filippov S.V., Polozov R.V., Sivozhelezov V.S. *Hypsometric mapping based visualization of (bio) macromolecular 3D structures* (Keldysh Institute Preprints. Preprint N 61, 2019). (In Russ.)]
11. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. *Nature Methods*, 2012, vol. 9 (7), no. 671.
12. Photo Reactor – Nodal Image Processor. URL: <https://www.mediachance.com/reactor/index.html>.
13. G'MIC is a full-featured open-source framework for digital image processing. URL: <https://gmic.eu>.

VISUAL-DIFFERENTIAL ANALYSIS OF STRUCTURAL REALIGNATIONS WATER CLUSTER STRUCTURES LOCATED IN THE DOMAIN OF THE D-FF NANOTUBES

Filippov S.V., Likhachev I.V., Bystrov V.S.

IMPB RAS – Branch of KIAM RAS

st. prof. Vitkevich, I, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: fsv141@mail.ru

Abstract. In order to study of the structural features of water cluster structures (WCS), discovered during studies of the self-organization of diphenylalanine (FF) peptide nanotubes (L- and D-chiralities) inside their cavities, was performed 3D-modeling of D-FF nanotubes containing water in the channel cavity was performed. The simulation indicated the optimal number of water cluster molecules per unit cell (two turns of the spiral section), equal to 21 water molecules. To better understand the nature of structural rearrangements of the WCS that occur in the internal cavity of the D-FF channel during optimization, we developed a method of visual-differential analysis of conformational changes in biological macromolecules. Identifying (ID) and "hypsometric" projections were obtained: the outer surface of the water cluster structures located inside the D-FF PNT, the projections of the inner surface of the D-FF PNT channel. Analysis of the ID projections of water clusters in the initial and optimized states revealed a slight change (+0.568%) in the available surface of oxygen atoms and hydrogen atoms (-0.68%). A visual analysis of the ID projections revealed significant structural changes in the structure of the water cluster. To describe them, three "hypsometric maps" were used to compose complex "topographic maps" and hybrid (2D/3D) models, showing the regions most likely involved in the formation of stable hydrogen bonds and the nature of changes in the structure of the water cluster.

Key words: peptide nanotubes, PNT, diphenylalanine, FF-NT, visual differential, 3D, projection, hypsometric, model, Blender, PhotoReactor, G'MIC.

ФОТОИНДУЦИРОВАННЫЙ ПЕРЕНОС ЗАРЯДА В МОЛЕКУЛЕ НИЛЬСКОГО КРАСНОГО

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: 13.07.2020

Аннотация. При помощи нестационарной теории функционала плотности изучены электронные состояния молекулы флуоресцентного красителя нильского красного в водном растворе. Исследованы переходы между этими состояниями, соответствующие поглощению молекул красителя в видимой области спектра. Проведенные вычисления показали отсутствие скручивания амидоэтильной группы при возбуждении молекулы вследствие поглощения фотона. Фотоиндуцированный перенос заряда оказался незначительным. Вычислены и проанализированы с точки зрения теории сольватохромизма дипольные моменты основного и возбужденных состояний. **Ключевые слова:** нильский красный, нестационарная теория функционала плотности, модель поляризуемой сплошной среды, электронные переходы, молекулярные орбитали, сольватохромизм.

ВВЕДЕНИЕ

Классический флуоресцентный краситель нильский красный (NR, рис. 1) – диэтиламино-5Н-бензо[α]феноксазин-5-он – впервые был синтезирован в 1896 г.

Электронные спектры поглощения и испускания молекулы NR сильно зависят от ее окружения. Это свойство NR широко используется, для изучения полярности органических растворителей и их смесей (сольватохромизм [1]), в том числе жидких кристаллов и ионных жидкостей. Благодаря этому NR применяется также в качестве флуоресцентного маркера для исследования локальной полярности разнообразных систем, с которыми он нековалентно взаимодействует: циклодекстринов, липидов, гидрофобных поверхностей белков, полимерных пленок, а также двух- и трехкомпонентных водно-органических смесей с поверхностно-активными веществами, цеолитов. NR используется как флуоресцентный маркер и в ковалентных и нековалентных (интеркаляционных) комплексах с нуклеиновыми кислотами. Применяются также производные NR, обладающие улучшенными фотофизическими свойствами.

NR обладает положительным сольватохромизмом, что проявляется в красном смещении максимумов поглощения и испускания (батохромном сдвиге) при переходе от неполярного растворителя к полярному. Например, для NR в н-гексане максимум поглощения λ_{max} составляет 484 нм, в воде 593 нм, а в муравьиной кислоте 634 нм [2]. Сольватохромизм обусловлен различием дипольных моментов молекулы в основном и возбужденном состоянии. Чем больше величина дипольного момента, тем больше данное состояние молекулы стабилизируется полярным растворителем, т.е. тем меньше энергия системы «растворенное вещество-растворитель». Очевидно, что для более полярного растворителя эти эффекты проявляются сильнее. Таким образом, если дипольный момент молекулы в основном состоянии больше, чем в возбужденном, соответствующая разность энергий этих состояний возрастает с увеличением полярности растворителя (отрицательный сольватохромизм, или гипсохромный сдвиг). В противоположном случае растворенное вещество обладает положительным сольватохромизмом (батохромный сдвиг) [2]. Для молекулы NR дипольные

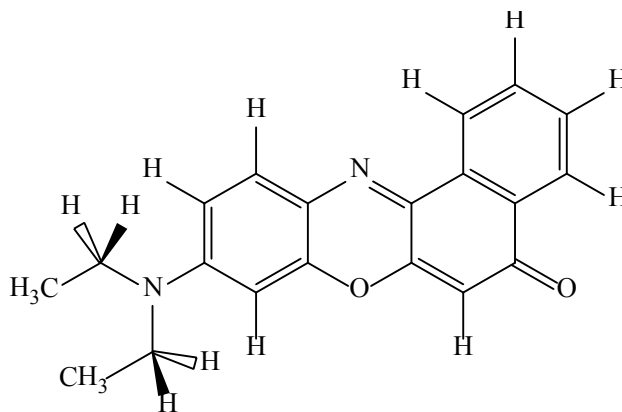


Рисунок 1. Структурная формула нильского красного

моменты в основном и возбужденном состояниях, согласно экспериментальным данным [3], составляют соответственно ≈ 8 Д и ≈ 10 Д (см. данные других авторов в «Результатах и обсуждении»).

Увеличение дипольного момента молекулы NR при поглощении кванта света и переходе в возбужденное состояние обусловлено внутримолекулярным переносом заряда от аминодизетильной группы к карбонильной (рис. 1). Sarkar et al. впервые предложили, что возбуждение молекулы NR сопровождается поворотом аминодизетильной группы вокруг одинарной σ -связи N-C, с выходом из плоскости хромофора (Twisted Intramolecular Charge Transfer – TICT). Это, по мнению авторов, объясняло наличие двух пиков в спектре испускания NR («двойная флуоресценция»). Однако гипотеза TICT вызывает разногласия. Ghoneim, Dutta et al., Datta et al. поддержали идею TICT, в то время как Kowski et al. высказались против нее. При этом все упомянутые работы были чисто экспериментальными и не сопровождались теоретическими расчетами на атомном уровне. Golini et al. впервые вычислили энергии и дипольные моменты для различных состояний молекулы NR полуэмпирическим методом квантовой химии ZINDO/S, а также измерили спектры поглощения и излучения NR и оценили его сольватацию при помощи модели Онзагера. Результаты Golini et al. подтвердили возможность существования скрученного возбужденного состояния молекулы NR. В то же время, теоретическое объяснение полученных ими экспериментальных спектров излучения не включает в себя TICT. Cser et al. на основании экспериментального исследования флуоресценции NR в различных органических растворителях и обнаруженного в ходе него пренебрежимо малого влияния их вязкости на время флуоресценции сделали вывод об отсутствии вращения диетиламиногруппы. Результаты *ab initio* и полуэмпирических расчетов Dias et al. показали большую устойчивость плоской конформации молекулы NR по сравнению со скрученной. Согласно их вычислениям, при возбуждении молекулы NR происходит плоскостной внутримолекулярный перенос заряда (PICT), а не TICT. Tuck et al. выполнили квантовохимические вычисления (CIS и TD-DFT) с неявным заданием растворителя (модель PCM) и также не обнаружили явления TICT [47]. Guido et al. при помощи TD-DFT с учетом вибронной связи детально исследовали первое возбужденное состояние молекулы NR в неполярном растворителе (н-гексан) с целью выяснения его сущности (TICT vs. PICT). Согласно их результатам, двойная флуоресценция NR обусловлена не TICT, а вибронной связью. А.Я. Freidzon et al. на основе высокоуровневых *ab initio* расчетов энергетики молекулы NR в различных растворителях сделали вывод о преобладании TICT в полярных протонных растворителях. При этом скрученная конформация молекулы NR стабилизируется Н-связями с растворителем. В то же время, в полярных апротонных растворителях имеет место плоскостная конформация NR.

В силу широкого применения NR исследованию его фотофизических свойств посвящено множество как упомянутых выше экспериментальных, так и теоретических работ. Большинство расчетов поглощения и испускания NR выполнены для органических растворителей; вычисление структурных и спектральных характеристик NR в водном растворе проводилось лишь в относительно небольшом числе работ [4-9]. Вместе с тем, использование NR в качестве флуоресцентного маркера биологически важных молекул (см. выше) требует использования именно водных растворов, хотя NR мало растворим в воде. Следует учесть, однако, что в воде и других полярных растворителях интенсивность флуоресценции NR очень слаба. В настоящей работе методом TD-DFT выполнен расчет электронного спектра поглощения NR в водном растворе согласно методике [10] и выполнен сравнительный анализ полученных результатов с данными других авторов.

МЕТОДЫ

Исходная пространственная структура молекулы NR была взята из базы данных <http://www.chemspider.com> (ChemSpider ID 58681). Добавление атомов водорода и их предварительная оптимизация выполнялись при помощи программы HyperChem 8.0. 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 молекулы NR выполнялся на уровне теории O3LYP/6-31G(d,p), который показал наилучшее совпадение расчетных максимумов поглощения с экспериментальными для водных растворов обеих форм красителя. Функционал O3LYP [13] представляет собой существенно усовершенствованную версию популярнейшего, но устаревшего функционала B3LYP.

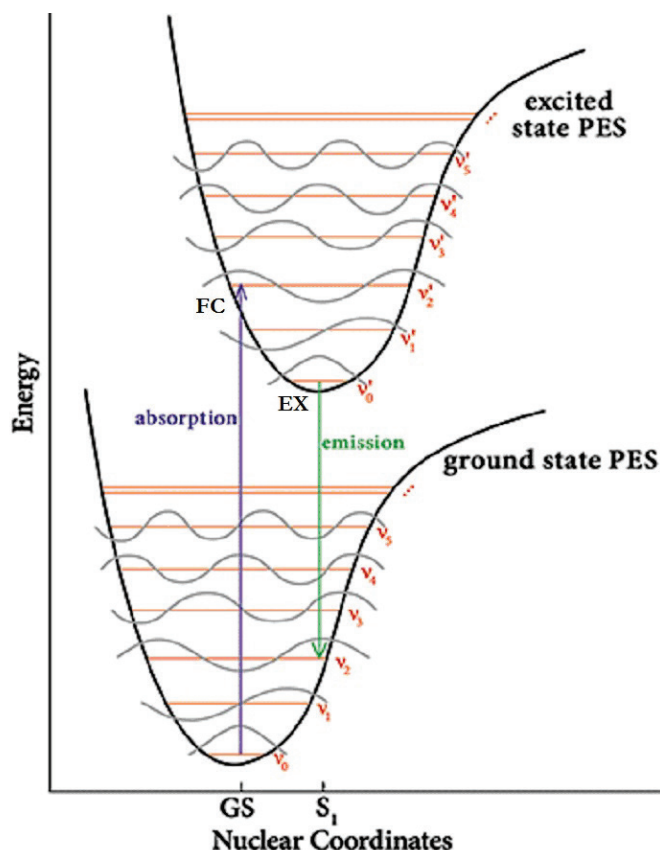


Рисунок 2. Энергетические диаграммы электронных и колебательных переходов [10]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень теории O3LYP/6-31G(d,p) дает 450 молекулярных орбиталей (МО), из которых 84 являются занятыми, а 366 – незанятыми. Таким образом МО №84 является наивысшей занятой (НОМО), а МО №85 – наинизшей незанятой (LUMO). Как упоминалось выше, водный раствор NR имеет максимум поглощения в видимой области $\lambda_{\text{max}}=593$ нм ($\pi \rightarrow \pi^*$ переход). Согласно нашим расчетам, он обусловлен, главным образом, синглетным переходом НОМО $\rightarrow$ LUMO (рис. 3), т.е. $S_0 \rightarrow S_1$.

Распределение электростатического потенциала в основном и возбужденных состояниях вблизи поверхности NR показано на рисунке 4 (оттенки красного соответствуют положительным значениям потенциала, синего – отрицательным). Как видно, между собой основное и возбужденные состояния для данной формы молекулы отличаются незначительно. Это свидетельствует о незначительном внутримолекулярном переносе заряда при фотовозбуждении NR.

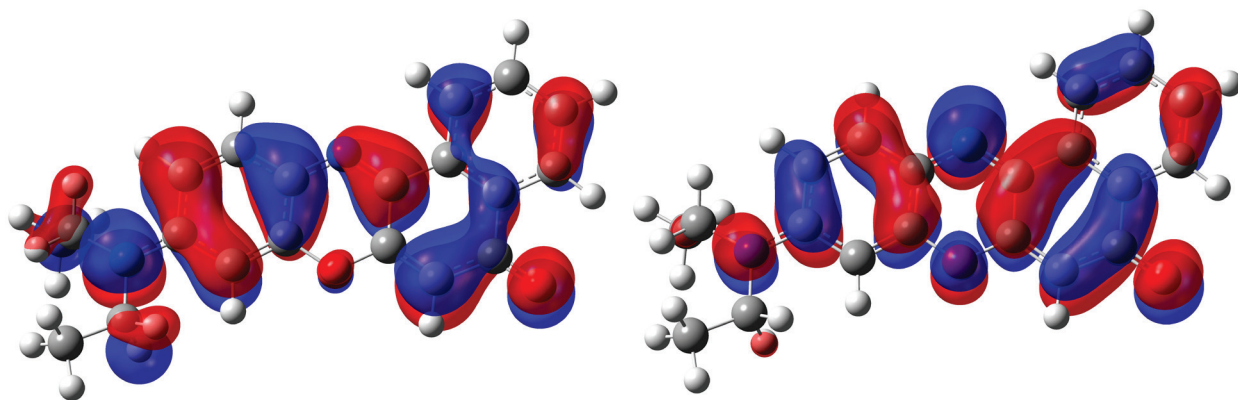


Рисунок 3. НОМО (слева) и LUMO (справа). Положительные доли показаны красным, отрицательные – синим

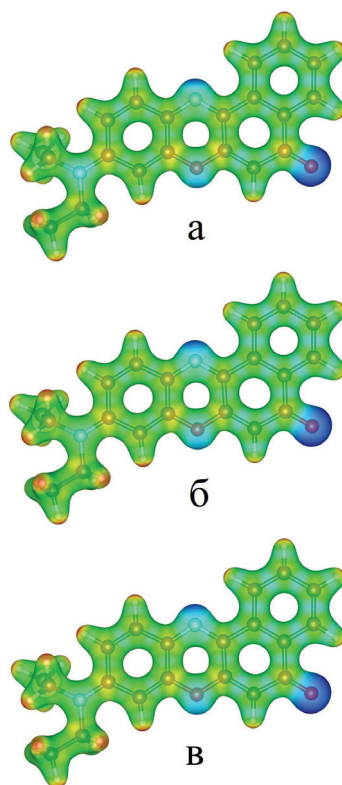
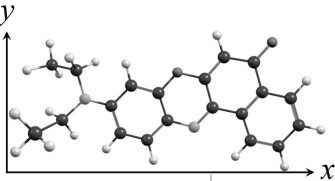


Рисунок 4. Визуализация электростатического потенциала NR в основном (а), франк-кондоновском (б) и равновесном возбужденном (в) состояниях

Результаты расчета дипольных моментов NR (табл. 1) качественно согласуются со стандартной теорией сольватохромизма (см. ВВЕДЕНИЕ), а также с экспериментальными и расчетными данными других авторов [3].

Таблица 1. Расчетные дипольные моменты (Д)

 Координатные оси направлены вдоль главных осей инерции молекулы			
Дипольный момент	Основное состояние	Франк-кондоновское состояние	Равновесное возбужденное состояние
μ_x	-13,15	-18,31	-17,82
μ_y	-3,93	-3,90	-3,93
μ_z	-0,38	-0,39	-0,46
μ	13,73	18,72	18,26

Величины угла скручивания θ аминодиэтильной группы вычислялись путем усреднения по двум двугранным углам: C2-C1-N28-C36 и C5-C1-N28-C29. Расчетные значения для основного состояния: $\theta_0 = (1,66^\circ + 12,68^\circ)/2 = 7,17^\circ$, для возбужденного состояния $\theta_1 = (1,13^\circ + 11,72^\circ)/2 = 6,43^\circ$. Таким образом, наши вычисления показывают, что скручивания аминодиэтильной группы при возбуждении NR практически не происходит, что согласуется с результатами других авторов (см. ВВЕДЕНИЕ).

ВЫВОДЫ

1. Поглощение света молекулой NR в водном растворе с $\lambda_{\max} = 593$ нм соответствует электронному переходу $S_0 \rightarrow S_1$, HOMO $\rightarrow$ LUMO.
2. Фотоиндуцированный перенос заряда NR в водном растворе незначителен.
3. Расчетные дипольные моменты основного и возбужденных состояний NR хорошо согласуются как с экспериментальными и расчетными данными других авторов, так и со стандартной теорией сольватохромизма.
4. Скручивание аминодиэтильной группы при фотовозбуждении молекулы NR отсутствует.

Список литературы / References:

1. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.
2. Deye J.F., Berger T.A., Anderson A.G. Nile Red as a Solvatochromic Dye for Measuring Solvent Strength in Normal Liquids and Mixtures of Normal Liquids with Supercritical and Near Critical Fluids. *Anal. Chem.*, 1990, vol. 62, pp. 615-622.
3. Kowski A., Bojarski P., Kuklinski B. Estimation of ground- and excited-state dipole moments of Nile Red dye from solvatochromic effect on absorption and fluorescence spectra. *Chem. Phys. Lett.*, 2008, vol. 463, pp. 410-412.
4. Freidzon A.Ya., Safonov A.A., Bagaturyants A.A., Alfimov M.V. Solvatofluorochromism and Twisted Intramolecular Charge-Transfer State of the Nile Red Dye. *Int. J. Quant. Chem.*, 2012, vol. 112, pp. 3059-3067.
5. Han W.-G., Liu T., Himo F., Toutchkine A., Bashford D., Hahn K.M., Noodleman L. A Theoretical Study of the UV/Visible Absorption and Emission Solvatochromic Properties of Solvent-Sensitive Dyes. *ChemPhysChem*, 2003, vol. 4, pp. 1084-1094.
6. Murugan N.A., Kongsted J., Rinkevicius Z., Agren H. Color modeling of protein optical probes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, vol. 14, pp. 1107-1112.
7. Murugan N.A., Rinkevicius Z., Agren H. Modeling Solvatochromism of Nile Red in Water. *Int. J. Quant. Chem.*, 2011, vol. 111, pp. 1521-1530.
8. Marazzi M., Gattuso H., Monari A. Nile blue and Nile red optical properties predicted by TD-DFT and CASPT2 methods: static and dynamic solvent effects. *Theor. Chem. Acc.*, 2016, vol. 135, p. 57.
9. Ray A., Das S., Chattopadhyay N. Aggregation of Nile Red in Water: Prevention through Encapsulation in β -Cyclodextrin. *ACS Omega*, 2019, vol. 4, pp. 15-24.
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. Cohen A.J., Handy N.C. Dynamic correlation. *Mol. Phys.*, 2001, vol. 99, pp. 607-615.

PHOTO-INDUCED CHARGE TRANSFER IN THE NILE RED MOLECULE

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

¹Nakhimov Black Sea Higher Naval School
Dybenko st., 1a, Sevastopol, 299028, Russia

²Sevastopol State University

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

Abstract. The electronic states of a Nile red fluorescent dye molecule in an aqueous solution are studied using 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 performed calculations showed the absence of twisting of the aminodiethyl group upon excitation of the molecule due to absorption of a photon. The photoinduced charge transfer was found to be insignificant. 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: Nile red, time-dependence density functional theory, polarizable continuum model, electronic transitions, molecular orbitals, solvatochromism.

СПЕЦИФИКА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ ПОТЕКСВИРУСОВ

Долгов А.А.¹, Богачева Е.Н.¹, Ксенофонов А.Л.²

¹ ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН

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

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, дом 1, стр. 40, г. Москва, 119992, РФ, e-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию: 14.07.2020

Аннотация. Изучение структуры вирусных белков оболочки, а также возможностей их модификации и структурной перестройки крайне важно для разработки новых подходов для создания биотехнологической продукции, в том числе медицинского назначения. Вирусы растений обладают безусловным преимуществом при получении новых функциональных и биологически активных материалов, в частности перспективных вакцин, так как они не патогенны для млекопитающих, в том числе для человека. На примере типичного представителя группы потексвирусов - X-вируса картофеля (ХВК) исследована специфика пространственной структуры белков оболочки. Проведен системный анализ причин отклонений от глобулярной формы. Одна из причин - это биологическая функция защиты РНК. Проведено моделирование полноразмерного белка с помощью сервера I-Tasser и впервые рассмотрена конформация его N-конца. Предложен критерий компактности укладки полипептидной цепи в пространстве. В отличие от используемых в литературе эмпирических формул представлен способ расчета радиуса гирации белка по его первичной структуре, приведены значения радиусов гирации для различных типов аминокислотных остатков.

Ключевые слова: потексвирусы, X-вирус картофеля, моделирование пространственной структуры, радиус гирации.

Вирусы растений обладают безусловным преимуществом при получении новых функциональных и биологически активных материалов, в частности перспективных вакцин, так как они не патогенны для млекопитающих, в том числе для человека [1-4].

Потексвирусы представляют собой особую группу среди всех вирусов растений. Несмотря на низкую стабильность вирионов, многие вирусы этой группы накапливаются в растениях в очень больших количествах, уступая в этом отношении, наверное, только вирусу табачной мозаики. Кроме того, потексвирусы (как и другие гибкие вирусы растений) с трудом поддаются исследованию многими методами структурного анализа (ядерный магнитный резонанс, дифракция рентгеновских лучей на нитях и другие). Несмотря на то, что репликация потексвирусов в зараженных клетках изучена лучше многих других групп вирусов растений, о тонкой структуре частиц потексвирусов и их свободных белков оболочки известно немного.

Все это в полной мере относится к типичному представителю данной группы - X-вирусу картофеля (ХВК). Кроме того, белок оболочки (БО) ХВК обладает немалым числом собственных аномалий. Среди них можно назвать аномальную электрофоретическую подвижность и аномальные гидродинамические свойства БО, неспособность осаждаться в изoeлектрической точке и формировать вирусоподобные спиральные агрегаты и ряд других особенностей [5-7].

Вирионы ХВК представляют собой гибкие нитевидные частицы длиной 515 нм. 1270 субъединиц оболочки образуют левую спираль с диаметром $D = 13,0$ нм, шагом $H = 3,45$ нм и $n = 8,89$ субъединиц на виток [8]. Из опытных данных криоэлектронной микроскопии [8, 9] и третиной планиграфии [10-12] следует, что структура субъединицы ХВК существенно отличается от глобулярной, в частности, не существует гидрофобного ядра.

Высказано предположение, что изолированный белок оболочки ХВК, несмотря на высокое содержание альфа-спиральных участков, принадлежит к особой группе класса так называемых природно-неструктурированных белков. Они характеризуются повышенной гибкостью и, следовательно, аномальными гидродинамическими свойствами [13]. Главное отличие этих белков от структурированных (глобулярных) белков состоит в том, что они не имеют уникальной третичной структуры в изолированном виде, а приобретают ее после взаимодействия с партнерами. Их конформация в комплексе определяется партнером по взаимодействию, а не только собственной аминокислотной последовательностью, как это характерно для структурированных (глобулярных) белков.

Ключевым вопросом для сравнения структур является выбор критериев.

При анализе структуры использовали данные PDB-файла 6r7g [8], содержащего информацию о координатах центров атомов фрагмента вирусной оболочки ХВК. Нами предложен безразмерный нормированный критерий компактности укладки полипептидной цепи в пространстве

$$\sigma = \frac{R_g 2\sqrt{3}}{N \cdot d_{CA}},$$

где d_{CA} – расстояние между последовательными α -атомами, N – число остатков, R_g – радиус гирации или инерции – среднее расстояние между центрами атомов $|\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j|$ объекта. По определению

$$R_g^2 = \frac{\sum_k (r_k - \langle r \rangle)^2}{N} = \frac{\sum_{j,k} (r_k - r_j)^2}{2N^2}, (\langle r \rangle = \frac{\sum_{k=1}^N r_k}{N}).$$

Для полностью развернутой цепи $\sigma = 1$. В различных моделях цепей $R_g \sim N^\gamma$, где $\gamma = 0,5$ для свободно сочлененной цепи, $\gamma = 0,6$ в модели Флори, $\gamma = 0,588 \pm 0,001$ по расчетам теории возмущений [14]. С ростом N $\sigma \sim N^{\gamma-1} \rightarrow 0$. Выбор такого критерия обусловлен следующими доводами.

Выберем в качестве меры компактности системы из N точек среднее расстояние между точками, т.е. R_g . Для нормировки используем максимальное значение R_{gmax} , достигаемое при полностью развернутой цепи. Если длина звена d , то $R_{gmax}^2 = N^2 d^2 / 12$. Таким образом величина σ характеризует степень уменьшения среднего расстояния между точками по сравнению с максимальным для конфигурации цепочки, характеризующейся R_g .

Величину R_g можно непосредственно определить в экспериментах по малоугловому рассеянию нейтронов или рентгеновских лучей или ее можно рассчитать по данным о структуре, полученным другими методами (например, pdb-файлов). На возможность использования радиуса гирации для структурных оценок указано в работе [15].

В отличие от используемых в литературе эмпирических формул покажем, что радиус гирации системы, содержащей N точек и состоящей из k частей, так что в j -той части находится n_j точек ($j = 1..k$) можно представить в виде

$$R_g^2 = \sum_{j=1}^k n_j \cdot (d_j^2 + R_{gj}^2) / N$$

где d_j – расстояние от центра j -го компонента до общего центра, R_{gj} – радиус гирации j -того фрагмента. Радиус-вектор $\mathbf{r}_i$ i -той точки j -того фрагмента можно представить в виде $\mathbf{r}_i = \mathbf{d}_j + \mathbf{p}_{ji}$, где $\mathbf{p}_{ji}$ – вектор, соединяющий центр j -го компонента с i -той точкой. Тогда

$$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (\mathbf{d}_j + \mathbf{p}_{ji})^2 = \sum_{j=1}^k n_j d_j^2 + \sum_{i=1}^{n_k} p_{ji}^2 + 2 \cdot \mathbf{d}_j \cdot \sum_{i=1}^{n_k} \mathbf{p}_{ji} = \sum_{j=1}^k n_j (d_j^2 + R_{gj}^2) \quad \text{или}$$

$$R_g^2 = \sum_{j=1}^k v_j (d_j^2 + R_{gj}^2), \quad \text{где } v_j = n_j / N - \text{доля } j\text{-го компонента.}$$

Это дает возможность оценить вклад радиусов гирации аминокислотных остатков по первичной структуре белка.

Для элемента вторичной структуры – α -спирали из k точек с шагом H и n витков на оборот $\mathbf{r}_j = [a \cdot \cos(j\gamma), a \cdot \sin(j\gamma), j \cdot h]$, $j = 0..k-1$, $h = H/n$, $\gamma = 2\pi/n$ можно получить формулу

$$R_{gh}^2 = a^2 \left(1 - \frac{\sin^2(\frac{k\gamma}{2})}{\sin^2(\frac{\gamma}{2})} \right) + \frac{h^2(k^2 - 1)}{12}$$

Для идеальной α -спирали $a = 0.75$ нм, $n = 3.6$, $H = 5.4$ нм, $h = 1.5$ нм, $k \geq 5$

$$R_{gh}^2 = 0.5625 \left(1 - \frac{\sin^2(\frac{k\pi}{3.6})}{\sin^2(\frac{\pi}{3.6})} \right) + 0.1875(k^2 - 1)$$

Для нахождения радиуса гирации и вычисления σ нами разработана программа, детали которой можно узнать по адресу alaldolgov48@gmail.com. С ее помощью проведены расчеты радиуса гирации субъединиц оболочки ХВК и σ на базе PDB-файла 6r7g [8], содержащего информацию о координатах центров атомов фрагмента вирусной оболочки ХВК, содержащего 13 последовательных субъединиц спиральной оболочки, а также используемого в качестве модельного глобулярного белка лизоцима. Вычисленные значения σ для каждой из этих субъединиц вируса практически совпадают. Найденные значения R_g сопоставляли с расчетами по программе CRY SOL [16]. Отличие не превышало 0,2%. Радиусы гирации аминокислотных остатков рассчитывали, как среднее расстояние центра атома субъединицы до ее центра. Величина d_{CA} составила

Таблица 1. Значения R_g для различных типов аминокислотных остатков (АО)

АО	ALA	ARG	ASN	ASP	CYS	GLN	GLU	GLY	HIS	ILE
R_g , нм	0,147± 0,003	0,291± 0,022	1,952± 0,008	0,1955± 0,009	0,1737± 0,008	0,234± 0,009	0,233± 0,010	0,133± 0,006	0,226± 0,015	1,994± 0,005
АО	LEU	LYS	MET	PHE	PRO	SER	THR	TRP	TYR	VAL
R_g , нм	0,208± 0,004	0,2590± 0,014	0,228± 0,012	0,240± 0,010	0,166± 0,006	0,161± 0,006	0,175± 0,003	0,274± 0,016	0,271± 0,002	0,178± 0,002

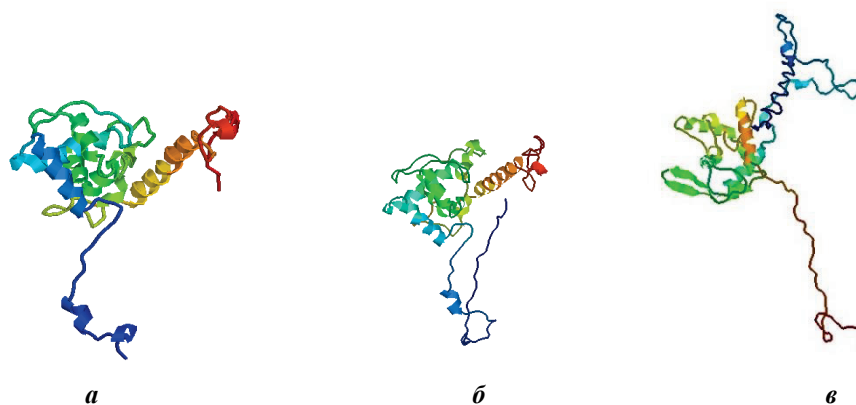


Рисунок 1. Пространственные модели X- и A-вирусов картофеля, построенные: а- по банку структур белков PDB (6r7g), б, в- по наиболее вероятным моделям белка X- и A- вируса, полученным с помощью сервера I-Tasser соответственно

$0,3793 \pm 0,0025$ нм. Для глобулярного белка лизоцима $\sigma = 0,09$. С увеличением σ силы дальнего взаимодействия между атомами ослабевают из-за увеличения расстояний между атомами, лабильность белка возрастает. Рассчитанные по данным 6r7g значения R_g для различных типов аминокислотных остатков приведены в таблице 1. Они в пределах ошибки совпадают с аналогичными значениями для лизоцима.

Основой для моделирования третичной структуры служила первичная структура X-вируса картофеля. Предсказание пространственной структуры выполняли с помощью сервера I-Tasser [17, 18]. При моделировании программа использовала, в основном шаблоны, полученные на основании данных криоэлектронной микроскопии (PDB-файлы 5fn1 и 6r7g). Впервые предсказан находящийся преимущественно в неупорядоченном виде N-конец макромолекулы. Отметим изменение вторичной структуры при моделировании полноразмерного белка. I-tasser практически не учитывает структурированность спиралей на уровне одного витка и часто уменьшает размеры спиралей, что, однако, не является критичным. Процент спиральности при этом уменьшился с 0,475 до 0,397 для модели 6r7g и построенной с помощью I-Tasser соответственно. Параметры соответствия для лучшей модели составили: C-score = -0,16; Расчетная ТМ-оценка = $0,69 \pm 0,12$ и RMSD = $6,0 \pm 3,7$ Å. С помощью сервера I-Tasser мы также выполнили предсказание и для субъединицы A-вируса картофеля (ABK) (269 АО). C-score=-1,34. Расчетная ТМ-оценка = $0,55 \pm 0,15$ и RMSD = $9,0 \pm 4,6$ Å. При этом рассчитанные значения σ для субъединицы ХВК из 6r7g (остатки 29-237), субъединиц ХВК и АВК (расчеты по I-Tasser) составили соответственно 0,09, 0,861 и 0,105. что указывает на большую неупорядоченность структуры АВК в сравнении с ХВК, что ранее было показано нами рядом физико-химических методов [19]. Построение и визуализацию пространственных структур модельных белков проводили с помощью программы RasMol 2.7.1. (<http://www.sourceforge.net/projects/openrasmol>).

Выводы. На примере типичного представителя группы потексвирусов - X-вируса картофеля (ХВК) исследована специфика пространственной структуры белков оболочки. Проведен системный анализ причин отклонений от глобулярной формы. Одна из причин - это биологическая функция защиты РНК. Предложен критерий компактности укладки полипептидной цепи в пространстве. В отличие от используемых в литературе эмпирических формул представлен способ расчета радиуса гирации белка по его первичной (или пространственной?) структуре, приведены значения радиусов гирации для различных типов аминокислотных остатков. Проведено моделирование полноразмерного белка с помощью сервера I-Tasser и впервые рассмотрена конформация его N-конца, отсутствующего в PDB- структуре.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00525а и в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема 0082-2019-0015, № АААА-А20-120031490003-7).

Список литературы / References:

1. Урываев Л.В., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Беляев А.М и др. Вирусы как объекты и инструменты нанобиотехнологий. *Вопросы вирусологии*, 2012, т. S1, с. 52-65. [Uryvaev L.V., Alchovskii S.V., Samochvalov E.I., Belyaev A.M. et al. Viruses as objects and instruments in nanobiotechnology. *Problems of virology*, 2012, vol. S1, pp. 52-65. (In Russ.)]
2. Архипенко М.В., Петрова Е.К., Никитин Н.А., Дубровин Е.В. и др. Искусственные вирусоподобные частицы, полученные in vitro из белка оболочки X-вируса картофеля и чужеродных вирусных РНК. *Acta Naturae*, 2011, т. 3(10), с. 42-48. DOI: 10.32607/20758251-2011-3-3-40-46. [Arkhipenko M.V., Petrova E.K., Nikitin N.A., Dubrovin E.V. et al. Artificial virus-like particles obtained in vitro from potato X virus envelope protein and foreign viral RNA. *Acta Naturae*, 2011, vol. 3 (10), pp 42-48. (In Russ.)]
3. Lico C., Schoubben A., Baschieri S., Blasi P., Sant, L. Nanoparticles in biomedicine: new insights from plant viruses. *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, 3471-3487 (2013). DOI: 10.2174/09298673113209990035.

4. Lico C., Benvenuto E., Baschieri S. The two-faced potato virus X: from plant pathogen to smart nanoparticle. *Front. Plant Sci.*, 2015, vol. 6, p. 1009. DOI: 10.3389/fpls.2015.0109.
5. Немых М.А., Новиков В.К., Арутюнян А.М., Калмыков П.В., Драчев В.А., Добров Е.Н. Сравнительное исследование стабильности структуры субъединиц белка оболочки Х-вируса картофеля в растворе и в составе вирусных частиц. *Молекулярная биология*, 2007, т. 41, № 4, с. 697-705. DOI: 10.1134/S0026893307040164. [Nemych M.A., Novikov V.K., Arutyunyan A.M. et al. Comparative structural stability of subunits of the potato virus X coat protein in solution and virus particles. *Molecular biology*, vol. 41, no. 4, pp. 697-705. (In Russ.)]
6. Добров Е.Н., Немых М.А., Лукашина Е.В., Баратова Л.А., Драчев В.А., Ефимов А.В. Модифицированная модель структуры субъединиц белка оболочки Х-вируса картофеля. *Молекулярная биология*, 2007, т. 41, № 4, с. 706-710. [Dobrov E.N., Novikov V.K., Lukashina E.V. et al. Modified model of the structure of the potato virus X coat protein. *Molecular Biology*, 2007, vol. 41, no. 4, pp. 638-641. (In Russ.)]
7. Архипенко М.В., Козловский С.В., Карпова О.В. Влияние N-концевой области белка оболочки Х-вируса картофеля на структуру вирусных частиц. *Докл. Акад. Наук*, 2003, т. 391, № 1, с. 117-119. [Arkhipenko M.V., Kozlovsky S.V., Karpova O.V., Arkhipenko M.V., Zayakina O.V., Rodionova N.P., Atabekov I.G. *Effect of the N-terminal domain of the coat protein of the potato virus X on the structure of viral particles. Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2003, vol. 391, no. 1, pp. 189-191. (In Russ.)]
8. Grinzato A., Kandiah E., Lico C., Betti C., Baschieri B., Zanotti G. Atomic structure of potato virus X, the prototype of the Alphaflexiviridae family. *Nat. Chem. Biol.*, 2020, vol. 16, pp. 564-569. DOI: 10.1038/s41589-020-0502-4.
9. Kendall A., McDonald M., Bian W. et al. Structure of Flexible Filamentous Plant Viruses. *Virology*, 2008, pp. 9546-9554. DOI: 10.1128 / JVI.00895-08.
10. Lukashina E., Ksenofontov A., Fedorova N. et al. Analysis of the role of the coat proteins n-terminal segment in potato virus x stability and functional activity. *Mol. Plant Pathology*, 2012, vol. 12, pp. 38-45. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2011.00725.
11. Baratova L.A., Grebenshchikov N.I., Dobrov E.N., Gedrovich A.V., Kashirin I.A., Shishkov A.V., Efimov A.V., Järvekülg L., Radavsky Y.A., Saarma M. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology*, 1992, vol. 188, pp. 175-180. DOI: 10.1016 / 0042-6822 (92) 90747-d.
12. Lukashina E. et al. Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions. *FEBS J.*, 2009, vol. 276, pp. 7006-7015. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07408.x.
13. Сердюк В.Н. Структурированные белки и белки с внутренней неупорядоченностью. *Молекулярная биология*, 2007, т. 41, № 2, с. 297-313. [Serdyuk I.N. Structured proteins and proteins with intrinsic disorder. *Molecular Biology*, 2007, vol. 41, no. 2, pp. 262-27. (In Russ.)]
14. Дой М., Эдвардс С. *Динамическая теория полимеров*. Москва, «Мир», 1998. [Doi M., Edwards S.F. *The Theory of Polymer Dynamics*. Moscow, "Mir", 1998. (In Russ.)]
15. Лобанов М.Ю., Богатырева Н.С., Галзитская О.В. Радиус инерции – индикатор компактности белковых структур. *Молекуляр. биология*, 2008, т. 42, № 4, с. 701-706. [Lobanov M.Yu., Bogatyreva N.S., Galzitskaya O.V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*, 2008, vol. 42, no. 4, pp. 623-628. DOI: 10.1134/S0026893308040195. (In Russ.)]
16. Svergun D., Barberato C., and Koch M. H. J. CRYSOLO – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, 1995, vol. 28, pp. 768-773. DOI: 10.1107/s0021889895007047.
17. Yang Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9, p. 40. DOI: 10.1186/1471-2105-9-40.
18. Jianyi Yang, Renxiang Yan, Ambrish Roy, Dong Xu, Jonathan Poisson, Yang Zhang. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 2015, vol. 12, pp. 7-8. DOI: 10.138/nmeth.3213.
19. Ksenofontov A.L., Paalme V., Arutyunyan A.M., Semenyuk P.I., Fedorova N.V., Rumvoldt R., Baratova L.A., Jarvekulg L., Dobrov E. N. Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A. *PloS one*, 2013, vol. 8, e67830. DOI: 10.1371/journal.pone.0067830.

PECULARITY OF THE POTEXVIRUS COAT SPATIAL STRUCTURE

Dolgov A.A.¹, Bogacheva E.N.¹, Ksenofontov A.L.²¹ N.N. Semenov Federal Research Center for chemical physics Russian Academy of Sciences*Kosygin St. 4, Moscow, 117977, Russia; e-mail: bogachenko@mail.ru*² A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU*Leninskye gory, 1, build. 40, Moscow, 119992, Russia; e-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru*

Abstract. The study of the structure of viral envelope proteins, as well as the possibilities of their modification and structural rearrangement is extremely important for the development of completely new approaches for creating biotechnological products, including medical ones. Plant viruses have an absolute advantage in the production of new functional and biologically active materials, in particular promising vaccines, since they are not pathogenic for mammals, including humans. On the example of a typical representative of the potexvirus group - potato X-virus, the specificity of the spatial structure of envelope proteins is studied. A systematic analysis of the causes of deviations from the globular form is carried out. One reason is the biological function of protecting RNA. A full-sized protein was simulated using the I-Tasser server and the conformation of its N-terminus was first considered. A compactness criterion for laying a polypeptide chain in space is proposed. In contrast to the empirical formulas used in the literature, a method for calculating the radius of gyration of a protein by its primary structure is presented, the values of the gyration radii for various types of amino acid residues are presented.

Key words: *potexvirus X-virus potato, simulation of the spatial structure, radius of gyration.*

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВОДНО-ГЛИЦЕРИНОВЫХ РАСТВОРОВ КАК ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕД ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОК

Иванова А.А.¹, Прядун В.В.¹, Ефанов А.Н.², Яковенко С.А.¹, Симоненко Е.Ю.¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: Annetkurella@yandex.ru

² CFEL, DESY

Notkestraße 85, Hamburg, 22607, Germany

Поступила в редакцию: 10.07.20

Аннотация. Криобиология активно развивается последние 10 лет и представляет собой не только фундаментальные исследования изменений, происходящих в растворах и клеточных структурах при низких температурах, но и несёт прикладное значение. Прикладными задачами современной криобиологии являются разработка криопротекторных сред, методов криоконсервации клеток, тканей, эмбрионов животных и человека, создание криобанков и прочее. При криоконсервации степень и скорость повреждения биологического материала определяется как образованием кристаллов льда вне и внутри клеток, сопровождающимся нарушением осмотического равновесия, избыточной дегидратацией, изменением величины pH и зарядовых характеристик мембран и др., так и скоростью охлаждения биообъекта. Известно, что глицерин, ДМСО, этиленгликоль не формируют кристаллических структур при понижении температуры, а остаются в аморфном стеклоподобном состоянии. При этом глицерин как наименее токсичное соединение для клеток является главным компонентом криопротекторных сред при замораживании больших объемов биологического материала. В работе проведено исследование термодинамических характеристик, а также рентгеноструктурный анализ водно-глицериновых растворов, позволяющих расширить понимание физико-химических процессов и структурных изменений криопротекторных сред.

Ключевые слова: криопротектор, калориметрия, рентгеноструктурный анализ, ВРТ.

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, а также для создания криобанков гамет для вспомогательных репродуктивных технологий [1,2]. Несмотря на то, что методы заморозки биоматериала активно развиваются, для некоторых типов клеток процент сохранения жизнеспособности после заморозки-разморозки остается низким. Так, при заморозке сперматозоидов, потери клеток составляют 40–60%. Основными причинами повреждения клеток при низкой температуре являются: температурный и осмотический шок, повреждения мембран из-за образования кристаллов экзо- и эндоцеллюлярного льда. При наличии в воде ядер нуклеации льда или ледонуклеирующих агентов (чужеродных частиц и примесей) происходит гетерогенная нуклеация (чаще в диапазоне от -2°C до -15°C). Также важную роль в степени повреждения клеток играет скорость охлаждения биообъекта. При «быстрой» заморозке биоматериал ускоренно проходит стадии фазовых превращений, что снижает время нахождения клеток в дегидратированном состоянии, сокращается время пребывания клеток в осмотическом неравновесии. Однако, при больших скоростях замораживания возрастает частота образования внутриклеточных кристаллов льда и повреждений, вызванных его воздействием, а также процесс медленного отогрева сопровождается рекристаллизацией, также приводящей к нарушениям физиологических концентраций растворов солей вне и внутри клеток, приводящим к лизису клеток. При медленной заморозке происходит формирование и рост внеклеточных кристаллов льда, которые могут повреждать клетки при сдавливании, а также происходит концентрация растворенных в цитоплазме клетки веществ. Использование криопротекторных растворов позволяет влиять на процесс нуклеации, уменьшая интервал температур, соответствующий данной области, а значит, избежать образования большого количества кристаллов льда. В качестве проникающих внутрь клетки компонент криопротектора чаще всего используют глицерин, так как водные растворы глицерина способны формировать стеклоподобное состояние, необходимое для повышения выживаемости клеток при заморозке. При приближении к температуре стеклования происходит резкое возрастание вязкости раствора без образования ядер кристаллизации и дальнейшее его затвердевание без формирования кристаллов льда. При замораживании чистый глицерин очень редко затвердевает, на его кристаллизацию влияет добавление воды или других примесей. Глицерин обладает высокой вязкостью, связанной с наличием в его молекуле гидроксильных групп, вследствие чего в его присутствии образуется пространственная сетка водородных связей, плотность которых в 3 раза больше, чем одноатомных спиртов. Было показано, что при концентрации глицерина в растворе выше 60% все молекулы воды образуют водородные связи с глицерином, поэтому с повышением концентрации глицерина вязкость водно-глицериновой смеси увеличивается, при этом снижаются скорость движения молекул растворенного вещества и их кинетическая энергия, что приводит к снижению скорости физико-химических процессов в биологических объектах [3]. При взаимодействии с водой глицерин формирует гидратную оболочку вокруг молекул воды. Формирование такой оболочки способствует стабилизации гидратационных решеток белков за счет перехода

молекул свободной воды в связанное состояние. Важно, что в присутствии глицерина формируется мелкозернистый лед, который переходит в аморфное состояние. При мелкокристаллическом замерзании растворов центры кристаллизации хотя и очень многочисленны, но не способны к росту. При наличии в среде глицерина при физиологических температурах он проникает внутрь клетки, где, предотвращает дегидратацию цитоплазмы, а также способствует образованию стеклообразной аморфной фазы. К числу положительных эффектов глицерина следует отнести также его способность уменьшать размер кристалла льда, поскольку его охлаждение сопровождается сжатием объема, что способствует снижению давления водного льда. Свойство глицерина сжиматься при замерзании является существенным, так как превращение воды в лед не сопровождается увеличением его объема. Кроме того, глицерин не является чужеродным соединением для биологических объектов, он поступает в пищу в составе жиров, образуется в ходе обмена веществ в печени, эфиры глицерина и триглицеридов включаются в состав клеточных мембран. Таким образом, он является менее токсичным, по сравнению с другими проникающими криопротекторами, однако его высокие концентрации, которые позволили бы полностью избежать формирования кристаллов льда, также токсичны для клеток. Поэтому многие современные криопротекторные среды основаны на водно-глицериновом растворе, но концентрация глицерина в них от 10 до 15% по объему. Физико-химические свойства таких растворов плохо изучены, так как в них присутствует много стадий структурных изменений при понижении температуры. Поэтому важно исследовать термодинамические и структурные характеристики данных растворов, а также изучить процесс образования кристаллов льда при заморозке.

В настоящей работе для получения термодинамических показателей был использован метод адиабатической калориметрии, адаптированный для исследования жидких сред [4]. В работе использовался калориметр PPMS (Physical Property Measurement System, **Quantum Design, Inc., USA**). Изучаемый образец массой $m=28,42$ мг помещался в экспериментальный контейнер, охлаждался в калориметре до $T=77,4$ К со скоростью $0,115$ К/с, после чего методом квази-адиабатической калориметрии была получена зависимость теплоемкости от температуры при нагревании образца до $T=300$ К с шагом $0,002$ К/с. Процесс кристаллизации растворов был исследован с помощью рентгеноструктурного анализа. Измерения проводились на PETRA III (DESY, Гамбург, Германия). Проводилось исследование водно-глицеринового раствора с концентрацией глицерина 12%, основанного на буфере Hepes 20мМ (Sigma). Буфер включал в себя различные компоненты в обычных для клеточных сред концентрациях, воду (Sigma, W3500).

Молярная масса многокомпонентной среды $M_{г\text{р}}$ была определена по формуле 1, где $v_i / \sum v_i$ – мольные доли компонентов, M_i – молярная масса, и составила $20,84$ г/моль.

$$M_{г\text{р}} = \sum_{i=1}^k \left(\frac{v_i}{\sum v_i} M_i \right). \quad (1)$$

Такой раствор по составу схож с базовой частью большинства коммерческих криопротекторов, таких как SpermFreeze (LifeGlobal, США).

Анализ большого количества статей, а также исследования, проведенные нами ранее [4], показали, что для глицериновых растворов разных концентраций существует характерный профиль зависимости теплоемкости от температуры. На графике зависимости $C(T)$ чаще всего выделяются три основные области: область, в которой раствор является жидкостью или истинным раствором, гетерогенная область, низкотемпературная часть, где раствор представляется собой кристаллическое тело. В данной работе для водно-глицеринового раствора (12% об.) был также получен характерный глицериновый профиль (рис.1). На полученном графике представлена высокотемпературная область ($T > T_1 = 246,4$ К), в которой среда представляет собой жидкость. При $T_1 = 246,4$ К происходит переход из жидкого состояния в стеклообразное и представляет собой фазовый переход первого рода. В диапазоне от $T_1 = 246,4$ К до $T_2 = 168,3$ К – область гетерогенного состояния и низкотемпературный промежуток (ниже $T_2 = 168,3$ К). Определение точных температур фазовых переходов и изменений агрегатных состояний проводилось по максимуму производной теплоемкости от температуры. На график зависимости $C(T)$ видно, что при температуре $T = 204,1$ К также наблюдается максимум. Сложно однозначно определить природу этого перехода, скорее всего он вызван структурными изменениями в гетерогенной смешанной фазе. В некоторых статьях описывается образование образует двухфазной жидкостной дисперсной системы в области этих температур [5]. Температура перехода из жидкости в твердое тело для чистого глицерина была экспериментально определена много раз, ее наиболее точное значение составляет $T = 291,3$ К. Таким образом, по сравнению с глицерином в водном растворе глицерина с солями происходит сдвиг фазового перехода первого рода в область более низких температур.

Для определения термодинамических параметров изучаемых растворов при низких температурах была использована модель теплоемкости твердого тела Дебая. Для этого в области кристаллического состояния исследуемого состава, определяли значение температуры Дебая θ_D и n – число атомов, приходящихся на одну элементарную ячейку. По формуле Дебая рассчитывали экстраполяцию значений теплоемкости в области высоких температур. Результат можно видеть на рисунке 1. После определения значений θ_D и n из экспериментального графика вычитается величина экстраполированной теплоемкости по Дебаю. После чего могут быть рассчитаны изменения энтропии и энтальпии по следующим формулам:

$$\Delta S = \int_0^{T_n} \frac{c}{T} dT, \quad \Delta H = \int_0^{T_n} c dT,$$

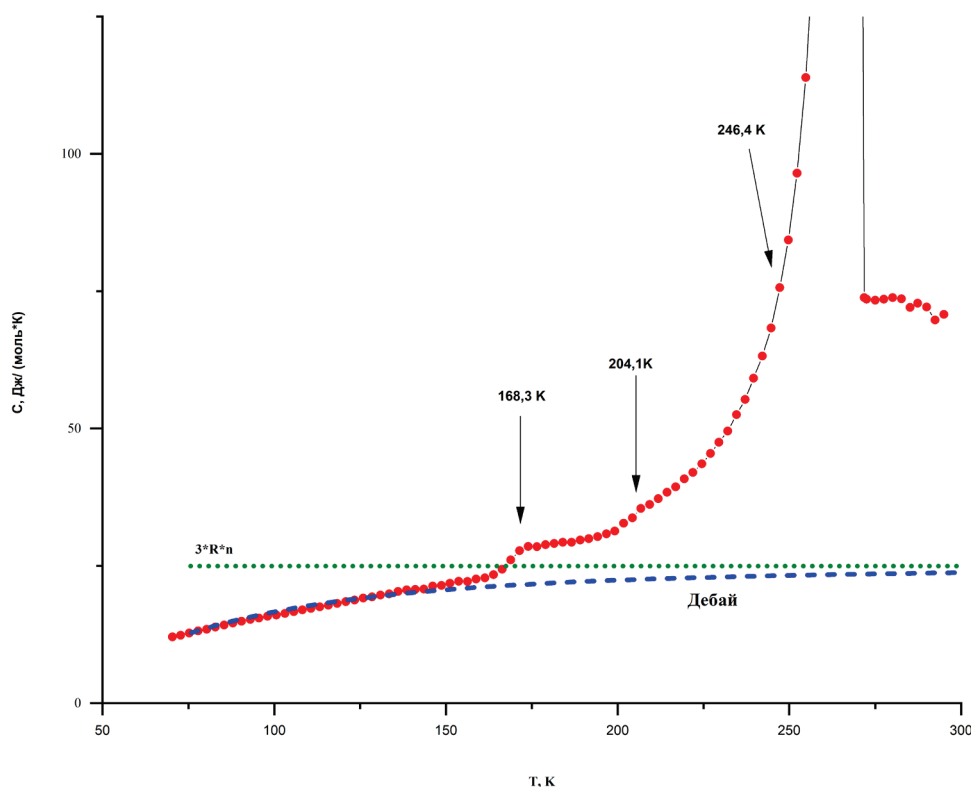


Рисунок 1. Зависимость молярной теплоемкости от температуры для водно-глицеринового раствора 12 об. %

где T_n – температура плавления на графике $C(T)$, полученном при вычитании из экспериментального графика $C(T)$ экстраполированной теплоемкости по Дебаю.

Для 12% водно-глицеринового раствора $\Delta S = 6,17 \frac{\text{Дж}}{\text{К} \cdot \text{моль}}$, $\Delta H = 1360 \text{ Дж/моль}$. Для более точного описания агрегатного состояния образца при температурах в районе $T = 170 \text{ К}$ было проведено сравнение экспериментальных данных с данными для глицерина, полученными в работе Гибсона [6]. Так как профили полученных графиков совпадают и температура перехода близка к наблюдаемой, можно предположить, что в данном промежутке наблюдается переход из стеклообразного состояния в кристаллическое. Также в данной работе с помощью метода рентгеноструктурного анализа было проведено сравнение дифракционных картин для водно-глицеринового раствора (50% глицерина), воды и исследуемого раствора (12% глицерина по объему). Дифракционная картина для 50% раствора соответствует стеклоподобному состоянию. Картина для воды демонстрирует небольшое количество очень интенсивных брэгговских пиков, что соответствует формированию нескольких очень больших кристаллов льда. В то же время дифракционная картина 12% раствора содержит множество брэгговских пиков небольшой интенсивности – данная картина характерна для ситуации, когда при замерзании раствора в толще формируется множество небольших кристаллов льда. Появление кристаллов в исследуемой среде связано с низкой концентрацией глицерина в криопротекторной среде и с наличием свободной воды, которая формирует кристаллы. Однако концентрация глицерина в

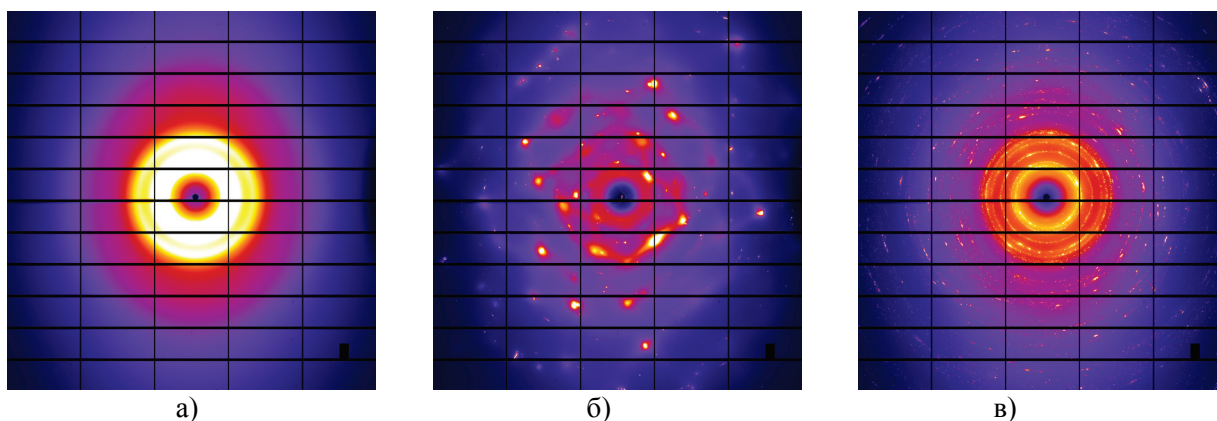


Рисунок 2. Дифракционные картины для водно-глицеринового раствора (50% глицерина) (а), воды (б), исследуемого раствора (12% глицерина) (в)

Таблица 1. Термодинамические характеристики исследуемого раствора

Параметры	Исследуемый раствор
ΔS , Дж/ (К·моль)	$6,17 \pm 0,03$
ΔH , Дж/ моль	1360 ± 68
Температура плавления, T_1 , К	246,4
Температура стеклования, T_2 , К	168,3

криопротекторных средах не может быть увеличена, так как это может повысить токсичность раствора. Поэтому необходимы дополнительные соединения – непроникающие компоненты (например, сахара, альбумин), которые будут разбивать формирующиеся кристаллы, но не будут влиять на токсичность среды.

Таким образом, в ходе данной работы были получены температуры плавления и стеклования, а также термодинамические характеристики водно-глицеринового раствора с содержанием глицерина 12% по объему, представленные в таблице 1, был изучен процесс формирования кристаллов в исследуемом растворе. Также подробно с помощью двух экспериментальных методов была изучена гетерогенная область на графике зависимости теплоемкости от температуры (от $T_2=168,3$ К до $T_1=246,4$ К на рис. 1), однако для точного описания изменения агрегатного состояния, происходящего в данной области, необходимо проведение дополнительных исследований.

Список литературы / References:

1. Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. *Cell. Biochem.*, 1997, vol. 64, 278 p.
2. Rall W.F., Fahy G.M., *Nature*, 1985, vol. 313, 573 p.
3. Popov I., Greenbaum G.A., Sokolov A.P., Feldman Y. *Phys. Chem. Chem. Phys. J.*, 2015, vol. 17 (27), pp. 18063-18071.
4. Симоненко Е.Ю., Прядун В.В., Иванова А.А., Бурмистрова Е.В., Васильев А.Н., Яковенко С.А., Биофизика, 2019, т. 64, вып. 1, с. 5-11. [Simonenko E.Yu., Pryadun V.V., Ivanov A.A., Burmistrova E.V., Vasiliev A.N., Yakovenko S.A. *Biophysics*, vol. 64, no. 1, pp. 1-6. (In Russ.)]
5. Ходько А.Т. *Вісник Харківського національного університету*, 2012, № 1026, Хімія. Вип. 21 (44). [Khod'ko A.T. *Kharkov University Bulletin*, 2012, no. 1026, Chemical Series, iss. 21 (44). (In Russ.)]
6. Gibson G.E., Glauque W.F. *J. Am. Chem. Soc.*, 1923, vol. 45, no. 1, 93 p.

TERMODYNAMIC AND STRUCTURAL FEATURES OF WATER-GLYCEROL SOLUTIONS AS THE MAIN COMPONENT OF CRYOPROTECTIVE MEDIA FOR CRYOPRESERVATION OF CELLS

Ivanova A.A.¹, Pryadun V.V.¹, Yefanov A.N.², Yakovenko S.A.¹, Simonenko E.U.¹

¹ Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory, 1, build. 2, Moscow, 119991, Russia: e-mail: Annetkurella@yandex.ru

² CFEL, DESY

Notkestraße 85, Hamburg, 22607, Germany

Abstract. Cryobiology has been actively developing for the past 10 years and it is not only a fundamental study of changes occurring at low temperatures in solutions and cell structures but it also carries applied value. The applied aims of modern cryobiology are development of cryoprotective media, methods for cryopreservation of cells, tissues, animal and human embryos, creation of cryobanks, etc. During cryopreservation the degree and rate of biological material damage is determined both by the formation of ice crystals outside the cells accompanied by a violation of osmotic equilibrium, excessive dehydration, change in pH and change of membrane characteristics, etc., and the cooling rate of the biological object. It is known that glycerol, DMSO, ethylene glycol do not form crystalline structures with decreasing temperature but remain in an amorphous glass state. At the same time glycerol as the least toxic compound for cells is the main component of cryoprotective media used for freezing of large volumes of biological materials. In the article the study of thermodynamic characteristics as well as X-ray diffraction analysis of water-glycerol solutions is presented. It expands the understanding of physicochemical processes and structural changes in cryoprotective media.

Key words: cryoprotectant, calorimetry, X-ray analysis, ART.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОРФОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Маслова Г.Т., Алексеенко Н.А., Коваленко М.Н., Титова А.В., Патапович М.П.,
Зажогин А.П.

Белорусский государственный университет

г. Минск, Республика Беларусь; e-mail: zajogin_an@mail.ru

Поступила в редакцию: 10.07.20

Аннотация. Изучена морфология образцов высохшей плазмы крови больных с онкопатологией головного мозга. Выявлены структурные особенности высохших капель плазмы крови пациентов с диагнозом опухоли мозга различной степени. 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 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: биологическая жидкость; морфология капли, лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; сдвоенные лазерные импульсы; пространственное распределение, послойный анализ, кальций.

В последние годы обозначился заметный рост заболеваний центральной нервной системы, в том числе опухолей головного мозга (ОГМ). Применение высокотехнологичных хирургических методик, лучевой терапии и химиотерапии при лечении глиобластом (последняя стадия ОГМ) позволило увеличить продолжительность жизни больных. Тем не менее, эти сроки ограничиваются 12-15 месяцами, редко – 18 и более месяцами [1], что обосновывает поиск новых подходов к лечению злокачественных ОГМ.

Лечение любой патологии напрямую зависит от точности диагностики и контроле лечения, а в случае ОГМ особенно актуальна ранняя диагностика, поскольку этим заболеванием страдает преимущественно трудоспособная часть населения. Первичные опухоли ЦНС находятся на третьем месте по причинам смертности в возрасте от 15 до 35 лет и втором месте у детей до 15 лет [1].

В клинической практике используют около двух десятков онкомаркеров (ОМ), обладающих достаточной диагностической значимостью, в то же время неизвестно ни одного ОМ, соответствующего идеальным параметрам. Для получения однозначного результата требуется тщательное сравнение многочисленных показателей. Поэтому поиски всестороннего подхода к диагностике ОГМ продолжаются.

Опухоли головного мозга встречаются практически в любом возрасте. Наибольшая доля заболевших приходится на возраст от 40 до 69 лет. Если средняя выживаемость больных с анапластическими астроцитами составляет около 24 мес., то ситуация у пациентов с глиобластомами значительно хуже. Так, по оценкам разных авторов средняя продолжительность жизни больных этой группы редко превышает 12 мес.

При возникновении и росте опухолей развивается комплекс метаболических нарушений, клинические проявления которых можно охарактеризовать как синдром эндогенной интоксикации, степень выраженности его отражает состояние альбуминовых показателей [2]. По мнению многих авторов, при большинстве заболеваний наблюдаются структурно-функциональные изменения молекулы сывороточного альбумина – основного транспортного белка плазмы крови, нарушение порядка самоорганизации которого на клеточном уровне, считается главным звеном в механизме патогенеза раковых заболеваний [2]. Показана возможность использования определения нейроспецифических белков в качестве дополнительного биохимического критерия поражения ГМ [3, 4]. Некоторые онкозаболевания могут быть замечены при анализе крови на наличие онкомаркеров, исключением является онкология головного мозга, которая диагностируется при осмотре специалистом врачом – неврологом, как правило, уже на стадии проявления клинических симптомов. В клинической практике используют около двух десятков онкомаркеров, обладающих достаточной диагностической значимостью, в то же время не известно ни одного ОМ опухолей мозга, обладающего высокой специфичностью. Для получения идеального результата требуется тщательное сравнение многочисленных показателей, поэтому поиски всестороннего подхода к диагностике ОГМ продолжаются. Многими авторами

было показано, что на основании анализа структур, образовавшихся при высыхании капли биологической жидкости, возможно выявлять широкий набор различных заболеваний [5-8]. Потенциальными возможностями, в этом плане, обладает и исследование ИК-спектров плазмы крови [9]. Составить представление о течении патологического процесса только по одному маркеру практически невозможно, что обуславливает необходимость комплексного подхода в диагностических исследованиях.

Известно, что биологическая жидкость (БЖ) играет роль функционального системообразующего фактора, связывая пространственно-временные структуры внутренней среды организма. Внутренняя среда организма реагирует на изменение пространственного порядка своих химических связей. В механизме патогенеза раковых новообразований главнейшим звеном следует считать нарушение порядка самоорганизации белка на клеточном уровне. В работах [5-8] авторами проведен сравнительный анализ уровня нейроспецифических белков и показана возможность их использования в качестве дополнительного биохимического критерия поражения ГМ.

Нами ранее было показано, что изучение динамики структурирования БЖ и пространственного распределения жизненно необходимых элементов в высохшей капле плазмы крови дает возможность уточнять диагноз, контролировать лечение пациентов с онкопатологией [10-12]. С этой же целью нами продолжены исследования структурирования высохшей капли плазмы крови пациентов с ОГМ, а также оценены возможности использования атомно-эмиссионной спектроскопии фаций плазмы крови для получения дополнительной информации.

В настоящей работе анализируется содержание жизненно необходимых элементов (ЖНЭ), морфология и пространственное распределение (по объему капли) кальция при высыхании капель плазмы крови пациентов с опухолями головного мозга.

Для изучения морфологии высохшей капли плазму 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 Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой. Микроскоп имеет видеонасадку, работающую с компьютером по USB-2 порту.

Изучена морфология высохших капель плазмы крови более 40 пациентов с опухолью 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 ОГМ (увеличение 300 раз).

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.) [5-7]. Идентифицируются различные типы фаций, кроме радиального нормотипа.

Объемной структурной деформации наименее всего подвержены высохшие капли плазмы крови донора и пациентов 1 и 2, поверхность которых относительно гладкая, но с аномальным расположением трещин. На всех полученных снимках картина структурирования, пусть в разной степени, но отличается от нормы (донор), что является признаком наличия патологии. Идентифицируются различные типы фаций, кроме радиального нормотипа. У 3 пациентов в фации обильно присутствуют морщины (складчатость), хаотично разбросанные широкие жгутовые трещины. Присутствуют трехлучевые трещины (маркер застойных явлений в организме), небольшие жгуты (признак гипоксии ГМ) и бляшки (интоксикация организма). У 4 пациентов с астроцитомой 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.

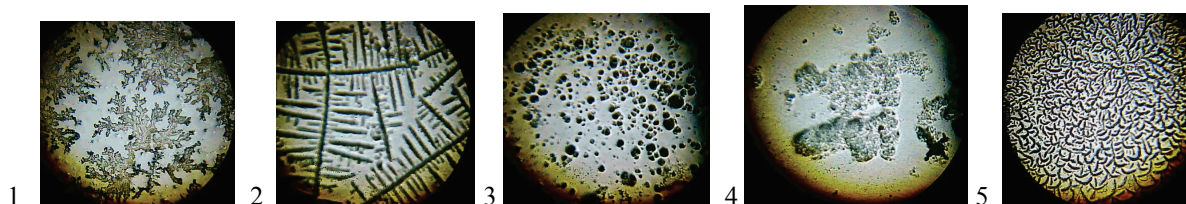


Рисунок 1. Снимки центральной части высохших капель плазмы крови. Диагноз пациентов 1 и 2 – диффузная астроцитомы, степень патологии – G II. Пациенты 3 и 4 – глиобластома, степень патологии G IV. 5 – донор

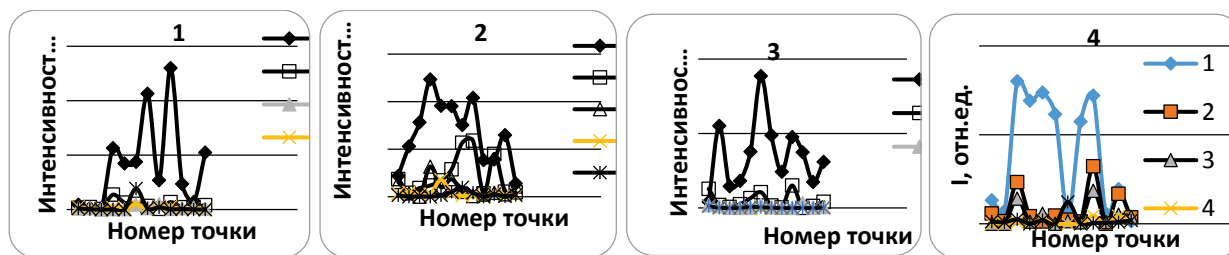


Рисунок 2. Интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в атомно-эмиссионных спектрах плазмы крови пациентов

В настоящей работе для оценки процессов резервной связывающей способности альбумина по кальцию изучено пространственное распределение кальция в высохших каплях плазмы крови пациентов с диагнозом опухоль головного мозга. 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 amino- и карбоксильными группами белковых молекул, что определяет картину структурирования БЖ.

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. 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.

На рисунке 2 представлена зависимость интенсивности линий кальция в спектрах высушенных капель плазмы пациентов с диагнозом астроцитомы (1 и 2) и глиобластомы (3 и 4).

Очевидны существенные различия в характере распределения кальция в высохшей капле плазмы крови пациентов. Хорошо известно, что у здорового человека кальций распределен только по поверхности высохшей капли, в центральной части капли оценивается доля ионизированного кальция. При равномерной диффузии БЖ к краям в процессе испарения жидкости максимальная концентрация связанного кальция приходится на краевой белковый валик.

Приведенные данные показывают, что у больных с ОГМ концентрация кальция ниже, чем у здорового человека. Кроме того, в процессе высыхания капель 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.

У пациентов 1 и 2 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. Максимальные концентрации кальция в центральной части фации особенно характерны для пациента 4 с более глубокой стадией поражения мозга. У него же определенное количество кальция приходится на второй и третий слои. У пациентов 1 и 2 аномальное структурирование белка хотя в значительной мере происходит на поверхности высохшей капли, но также в ее центральной части. Таким образом, по характеру локального послойного распределения кальция в высохшей капле с привлечением картины ее морфологии можно оценить степень патологии пациента.

Определению общего количественного содержания ЖНЭ в биосредах проводили на экспериментальной установке ЭМАС 200Д (пр-во ЗАО «Спектроскопические системы» Минск, Беларусь) [14]. 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.

Общее содержание жизненно необходимых элементов в образцах плазмы крови пациентов (1-4) с диагнозом опухоли головного мозга приведено в таблице 1. Содержание элементов установлено для достоверной вероятности 0,95. Внизу таблицы для сравнения приведены референтные концентрации (верхняя и нижняя граница) для каждого элемента в организме человека.

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

Пациент	Al	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn
34 до	29	3090	21274	466	354	248
34 после	15	2222	22435	424	261	171
42 до	44	3418	22376	395	265	428
42 после	53	3756	36678	462	459	517
14	18	2667	20456	631	354	398
24	17	4213	25676	257	286	291
Референтные значения						
Нижний уровень	0	1600	8800	36	69	90
Верхний уровень	6	2500	10400	144	142	120

Анализ полученных данных свидетельствует о явных отклонениях содержания ЖНЭ от референтных допустимых колебаний у пациентов с новообразованиями. У всех пациентов обнаружено высокое содержание алюминия, железа, кальция.

Следует отметить, что обычно альбумин не связывает железо. Однако при различной патологии, связанной с нарушением функции альбумина, уровень нетрансферин-связанного железа может повышаться. Входя в структуру гемма железо участвует в транспорте кислорода гемоглобином, участвует в окислительно-восстановительных реакциях многих митохондриальных энзимов, однако обладает способностью генерировать свободные радикалы и активировать процессы ПОЛ [48]. При наличии патологии меняется конформация молекулы альбумина, что влечет за собой изменение его связывающей способности. Меняются центры связывания альбумина, их резервы, а, значит, его транспортная функция, что приводит к накоплению токсичных компонентов в организме.

Согласно данным таблицы, где представлены значения по содержанию некоторых важных эссенциальных элементов, можно говорить о том, что у пациентов с новообразованиями головного мозга различного происхождения содержания ЖНЭ существенно отличается от референтных значений.

Настоящее исследование с использованием указанных методов показало, что анализируя поверхность высохшей капли БЖ по структурным проявлениям и изменению концентрации кальция по поверхности и слоям в совокупности оценкой общего содержания ЖНЭ можно дать более достоверную оценку патологических

изменений в организме пациента, что может быть использовано как для поиска маркеров заболеваний, так и для контроля за ходом лечения.

Таким образом, анализ содержания химических элементов в плазме крови у пациентов с ОГМ позволил выявить особенности микроэлементных изменений в организме, что влечет за собой нарушения протекания многих биохимических и физиологических реакций при гипоксическом повреждении головного мозга. Показано достоверное превышение нормальных значений суммарного содержания для алюминия, кальция, железа и цинка в плазме крови. 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 химиотерапии. Выявленные микроэлементозы могут влиять на особенности клинического течения заболевания и обосновывают целесообразность дополнения терапии медикаментозными комплексами для коррекции минерального обмена.

Список литературы / References

1. Кобяков Г.Л., Смолин А.В. Онкология. Новые стратегии в лечении злокачественных глиом: краткий обзор научных публикаций ежегодного съезда общества нейроонкологов (SNO), 2011, № 7, с. 41-49. [Kobyakov G.L., Smolin A.V. Oncology. New strategies in the treatment of malignant gliomas: a brief review of scientific publications of the annual Congress of the society of neuro-oncologists (SNO), 2011, no. 7, pp. 41-49. (In Russ.)]
2. Коротова Р.Н., Жабина Р.М., Маслюкова Е.А., Мешечкин А.В. Комбинированное лечение опухолей головного мозга различного генеза. Паллиативная медицина, 2010, № 4, с. 49-54. [Korytova R.N., Zhabina R.M., maslyukova E.A., Meshechkin A.V. Combined treatment of brain tumors of various Genesis. Palliative medicine, 2010, no. 4, pp. 49-54. (In Russ.)]
3. Луковская Н.Д. Структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина у больных раком головы и шеи при лучевой терапии. Сибирский онкологический журнал, 2010, прил. № 1, с. 71-72. [Lukovskaya N.D. Structural and functional state of serum albumin in patients with head and neck cancer during radiation therapy. Siberian cancer journal, 2010, no. 1, pp. 71-72. (In Russ.)]
4. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Кушлинский Н.Е. Нейроспецифические белки в сыворотке крови у больных с опухолями головного мозга и неврологическими заболеваниями неопухолевой этиологии. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях, 2016, № 3, с. 90-95. [Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Kushlinsky N.E. Neuro-Specific proteins in blood serum in patients with brain tumors and neurological diseases of non-tumor etiology. Medico-biological and socio-psychological problems of safety in emergency situations, 2016, no. 3, pp. 90-95. (In Russ.)]
5. 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.)]
6. 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, no. 4, pp. 80-85. (In Russ.)]
7. Краевой С.А., Колтовой Н.А. Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей. Книга 1. Открытая капля. В 4 кн. М. 2013, с. 67-71. [Kraevoy S.A., Koltovoy N.A. Diagnosis on the basis of one blood drop. Crystallization of biological fluids. Book 1. Open drop. 4 books. M. 2013, pp. 67-71. (In Russ.)]
8. 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.)]
9. Комаров Р.Н., Гордеев А.С., Комаров Н.В., Канашкин О.В. Инфракрасная спектроскопия сыворотки крови в диагностике онкозаболеваний. Нижнегородский медицинский журнал, т. 2996, № 1, с. 98-100. [Komarov R.N., Gordecov A.S., Komarov N.V., Kanashkin O.V. Infrakrasnaya spektroskopiya syvorotki krovi v diagnostike onkozabolevanij. Nizhegorodskij medicinskij zhurnal, vol. 2996, no. 1, pp. 98-100. (In Russ.)]
10. Булойчик Ж.И. и др. Морфологическое и спектрофотометрическое исследование плазмы крови пациентов с аневризмой сосудов головного мозга. Журнал БГУ, Физика, 2018, № 1, с. 9-17. [Buloichik Zh.I. et al. Morphological and spectrophotometric study of blood plasma of patients with cerebral aneurysm. Journal of BSU. Physics, 2018, no. 1, pp. 9-17. (In Russ.)]
11. 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.)]
12. 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., Buloichik 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*, iss. 1, 2016, no. 3, pp. 51-62. (In Russ.)]

13. Булойчик Ж.И., Маслова Г.Т., Корзук В.В., Сергей М.А., Мавричев А.С., Державец Л.А. Применение атомно-эмиссионной спектроскопии 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., Mavrichiev 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.)]

14. 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.)]

USING MORPHOSTRUCTURE ANALYSIS AND ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY OF DRIED BLOOD PLASMA DROPLETS FOR THE DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH BRAIN TUMORS

Maslova G.T., Alekseenko N.A., Kovalenko M.N., Titova A.V., Patapovich M.P., Zajogin A.P.

Belorussian State University

4 Nezaleznasci avenue, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: zajogin_an@mail.ru

Abstract. Studied the morphology of the dried samples of blood plasma of patients with cancer of the brain. The structural features of dried blood plasma drops of patients diagnosed with brain tumors of various degrees were revealed. 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 fluids 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, and zinc was found both before and after the operation. 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: biological fluid; drop morphology; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; spatial distribution; layer-by-layer analysis; calcium.

**ЛАЗЕРНАЯ АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ,
МОРФОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ДЕГИДРАТИРУЮЩИХ КАПЕЛЬ
БИОЖИДКОСТЕЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У ПАЦИЕНТОВ С
ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА ПРИ ЛАЗЕРНОМ ОБЛУЧЕНИИ КРОВИ**

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

¹ Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии
ул. Ф. Скорины, 24, г. Минск, 220114, Беларусь; e-mail: tatiananovitskaya1108@mail.ru

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

Поступила в редакцию: 10.07.20

Аннотация. В данной работе установлено, что у пациентов на момент поступления в стационар имеются изменения в локальном пространственном распределении кальция и морфологической структуре дегидратирующих капель биожидкостей, которые характеризуются появлением широких, трехлучевых и жгутовых трещин в цельной крови и потерей симметрии в плазме. Выявлена исходно низкая активность супероксиддисмутазы в крови пациентов, которая нормализовалась после проведенного курсового лечения с включением внутривенного или надвенозного лазерного облучения крови дополнительно к стандартной терапии.

Ключевые слова: лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия, дегидратация капель биожидкости, морфологическая структура, хроническая ишемия головного мозга, окислительный стресс, лазерная гемотерапия.

В настоящее время цереброваскулярные заболевания ишемического генеза являются серьезной проблемой. Распространенность сосудистых заболеваний головного мозга неуклонно растет во всем мире.

Хроническая ишемия головного мозга (дисциркуляторная энцефалопатия – ДЭ) – 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 ДЭ являются атеросклероз артерий и артериальная гипертензия [1].

Дисциркуляторную энцефалопатию подразделяют на 3 стадии в зависимости от выраженности клинических симптомов. Первая стадия характеризуется в основном субъективными и вегетативными расстройствами, однако нередко определяются незначительно выраженные неврологические синдромы. У больных ДЭ 2-й стадии усугубляются когнитивные нарушения, становятся более выраженными неврологические синдромы, нередко теряется трудоспособность. В 3-й стадии заболевания диагностируются выраженные когнитивные изменения, органическая неврологическая симптоматика, тазовые нарушения [2].

В основе патогенетических механизмов ДЭ лежат следующие процессы: нарушение микрогемодикуляции, дефицит энергетических ресурсов, глутаматная эксайтотоксичность, внутриклеточное накопление кальция, лактатацидоз и окислительный стресс, что приводит к гибели клеток мозга [3, 4].

В антиоксидантной системе (АОС) 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 надвенозное лазерное облучение крови (НЛОК) в инфракрасной спектральной области, обладающие антиоксидантными, иммуномодулирующими, противовоспалительными свойствами. Адаптогенное действие низкоинтенсивного лазерного излучения реализуется на клеточном, тканевом, системном уровнях [5-7]. 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 цереброваскулярных заболеваниях актуально.

В последнее время в медицинской диагностике начинают применять 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. При различных вариантах нарушения мозгового кровообращения, в частности ДЭ, высохшая капля биожидкости может иметь, отличную от здорового человека структуру в зависимости от кинетики испарения воды из капли: вода уходит, а в оставшейся субстанции образуется густой гель и кристаллизуются соли [9].

Цель работы: изучить морфологическую структуру и количественное пространственное распределение кальция в дегидратирующих каплях плазмы, про-, антиоксидантное состояние у пациентов с ДЭ под влиянием лазерной гемотерапии.

В исследовании приняли участие 42 пациента с ДЭ 1-й и 2-й стадий, госпитализированных в РНПЦ неврологии и нейрохирургии г. Минска, которые были разделены на три группы: первую группу составили 15 пациентов (средний возраст $69,1 \pm 12,1$ лет), которые дополнительно к стандартной терапии (СТ) получали 8-10 сеансов ВЛОК с помощью полупроводникового лазера «Люзар МП» с длиной волны 0,67 мкм; вторую группу – 12 пациентов (средний возраст $67,9 \pm 5,8$ лет), которые дополнительно к СТ получали 8-10 сеансов НЛОК с помощью аппарата квантовой терапии «Витязь» с длиной волны 0,85 мкм; в третью группу вошли 15 пациентов (средний возраст $65,8 \pm 13,0$ лет), которые получали СТ; контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц, средний возраст которых составил $56,6 \pm 8,1$ лет.

Для оценки локального пространственного распределения кальция использовали лазерный многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр LSS-1. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 100 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов. Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы), временной интервал между сдвоенными импульсами 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения примерно 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

На рисунке 1 представлена зависимость интенсивности линий кальция в спектрах высохших капель плазмы пациентов с ДЭ (а – пациент до и после лечения ВЛОК, б – пациент до и после лечения НЛОК, в – пациент, получавший СТ). У пациентов до и после лечения имеются существенные различия в характере распределения кальция в дегидратирующих каплях плазмы. На момент госпитализации кальций распределен хаотично по поверхности капли, максимальное его содержание регистрируется в верхних слоях. После лечения у данных пациентов наблюдается тенденция к улучшению распределения кальция, но не происходит полного восстановления. Полученные данные показывают, что у пациентов с ДЭ происходит хаотичное образование центров коагуляции, наблюдается разброс концентрации кальция как по поверхности, так и по слоям. Это обусловлено нарушением связывающей способности альбумина, которая вызывает аномальную коагуляцию белка и увеличение концентрации кальция в более глубоких слоях.

Для морфоструктурного анализа дегидратирующих капель крови и плазмы (проводили до и после лечения) образцы готовили по следующей методике: каплю цельной крови или плазмы наносили на поверхность тщательно промытой подложки из полиметилметакрилата с помощью микропипетки. Объем капли составлял 10 мкл. Процесс сушки проходил при температуре 20-25 °C и относительной влажности воздуха 60-65 % в течение 90-120 минут. Для получения снимков использовали оптический микроскоп Биолам (Россия) со светодиодной подсветкой и веб-камерой (окуляр 9х, объектив 15х).

При высыхании капли биожидкости испарение происходит равномерно по всей её поверхности. При этом наблюдается неравномерное распределение растворенных в капле веществ. Это связано с тем, что она имеет разную толщину слоя: тонкую на периферии и утолщенную в центре. При высыхании капли в силу действия осмотических сил возрастает концентрация соли в центральной области, а белки и другие растворенные вещества

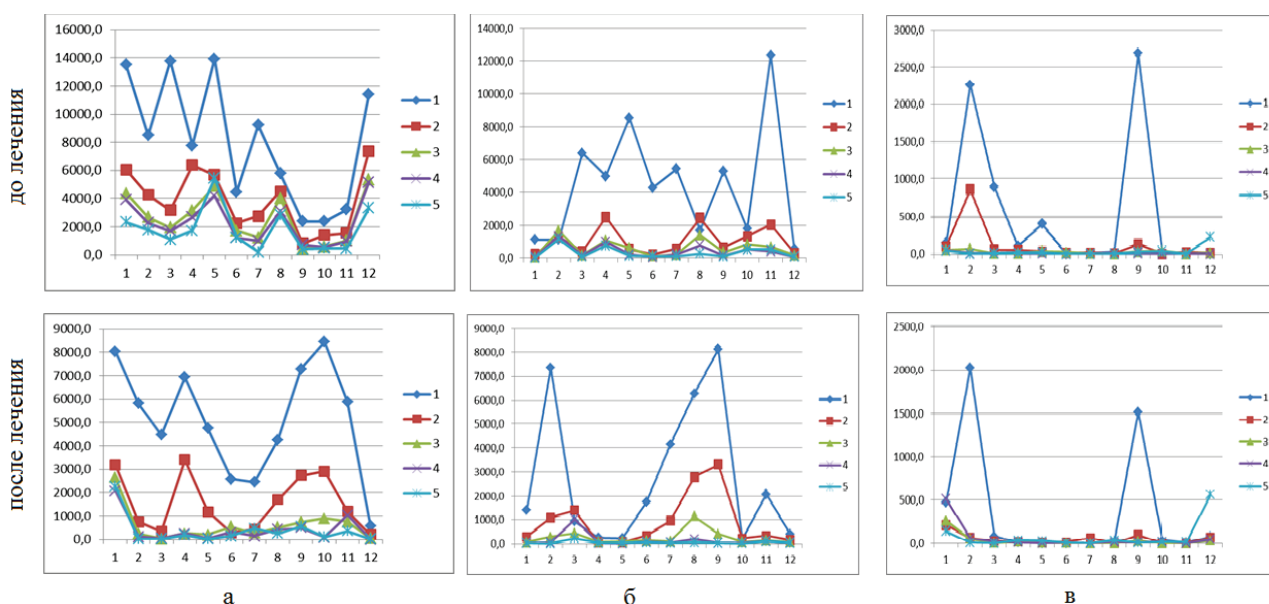


Рисунок 1. Интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в атомно-эмиссионных спектрах плазмы крови пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией (по вертикальной оси отображена интенсивность линий кальция в отн.ед., по горизонтальной – номера точек)

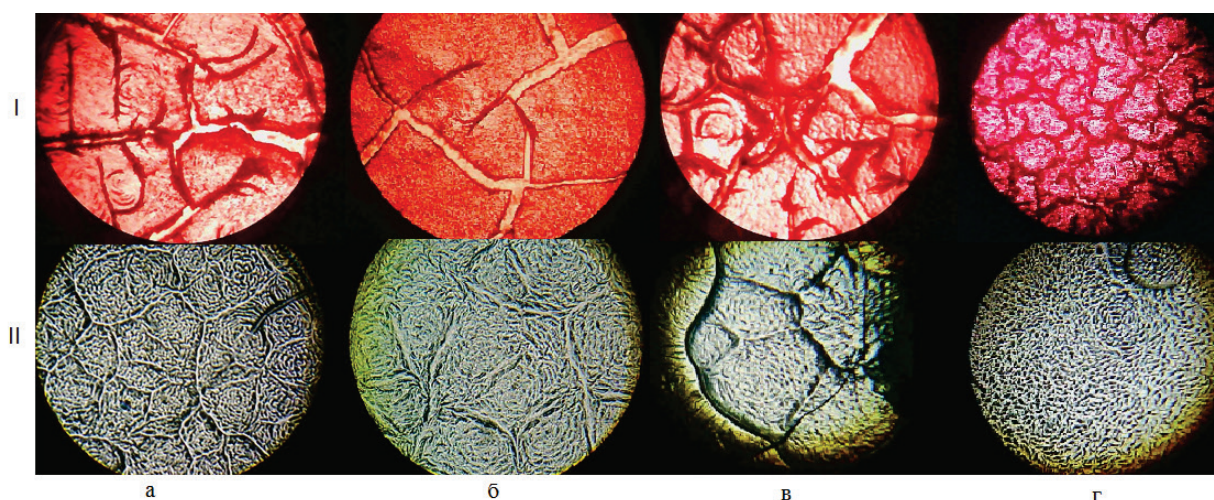


Рисунок 2. Морфологическая структура дегидратирующих капель крови и плазмы у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией до лечения (увеличение $\times 135$)

с высоким молекулярным весом перемещаются на периферию капли. В результате полного высыхания капли биожидкости соли вытесняют органические вещества из воды с образованием твердой фазы и формированием краевой зоны, представленной структурами органического происхождения и центральной кристаллической – солевыми образованиями. Механизмы переноса коллоидных частиц в высыхающих каплях в настоящее время достаточно хорошо изучены как теоретически, так и экспериментально [13], но влияние диффузии на перемещение внутри капли молекул малого размера при ДЭ требует изучения.

На рисунке 2 представлена морфологическая структура центральной зоны дегидратирующих капель крови (I) и плазмы (II) пациентов до лечения (а, б, в) и здорового лица (г).

При изучении центральной зоны дегидратирующей капли крови здорового человека мы видим четко структурированную, мелкоячеистую картину растрескиваний. В то время как качественный сравнительный анализ структуры поверхности образцов цельной крови показал, что у пациентов с ДЭ имеются отличия от здоровых лиц: преобладает наличие широких (маркер склеротических изменений), трехлучевых (признак застойных явлений в организме, в том числе в тканях головного мозга) и штриховых (признак ДЭ) трещин, также у некоторых пациентов имеются жгутовые трещины, которые свидетельствуют о гипоксии.

Структура фаций плазмы пациентов имеет отличия от здоровых лиц и характеризуется потерей симметрии расположения основных элементов фации, появлением трещин в центральной зоне.

На рисунке 3 представлена морфологическая структура дегидратирующих капель крови (I) и плазмы (II) пациентов после лечения (а – ВЛОК, б – НЛОК, в – СТ) и здорового лица (г).

После проведенной терапии у всех пациентов наблюдается улучшение морфоструктуры дегидратирующих капель крови (практически не наблюдается штриховых трещин, уменьшается количество широких и жгутовых трещин), но не происходит полной нормализации. Морфологическая структура дегидратирующих капель плазмы у пациентов, получавших лазерную гемотерапию, после лечения практически не изменялась.

На 1-е–2-е сутки после госпитализации, а также после курсового лечения определяли активность СОД в цельной крови по реакции супероксидзависимого окисления кверцетина [10]. Активность каталазы определяли

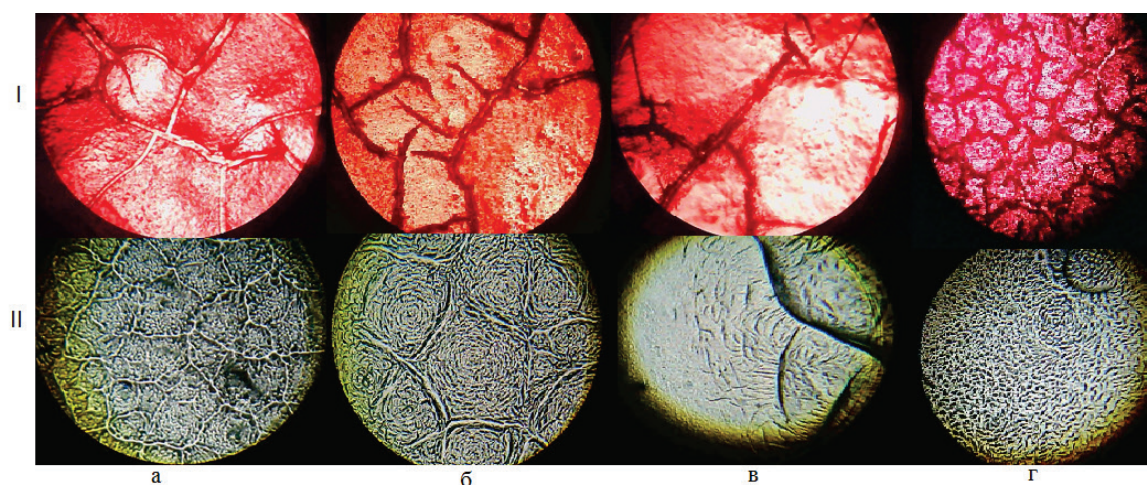


Рисунок 3. Морфологическая структура дегидратирующих капель крови и плазмы у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией после лечения (увеличение $\times 135$)

Таблица 1. Показатели про-, антиоксидантной системы крови у пациентов с ДЭ до и после проведенной терапии и у здоровых лиц

Показатель	1-я группа, пациенты с ДЭ (ВЛОК), n=15	2-я группа, пациенты с ДЭ (НЛОК), n=12	3-я группа, пациенты с ДЭ (СТ), n=15	Контрольная группа, здоровые лица, n=20
СОД, Е/мл до лечения	75,4 (62,1-105,5) p=0,005	76,8 (60,2-105,2) p=0,01	104,3 (75,0-110,2)	106,3 (92,9-117,6)
СОД, Е/мл после лечения	86,3 (59,9-122,3)	77,8 (63,4-130,5)	88,9 (71,6-107,3)	
Каталаза, усл.ед./с*мл до лечения	12,6 (7,2-18,0)	11,4 (5,7-21,3)	19,2 (11,4-27,0)	18,6 (13,2-28,8)
Каталаза, усл.ед./с*мл после лечения	21,0 (10,8-31,8)	27,9 (8,7-46,2) p=0,01	21,0 (13,2-33,0)	
ТБК-П, мкмоль/л до лечения	2,46 (2,15-2,84)	2,16 (1,73-2,92)	2,15 (1,69-3,33)	2,08 (1,8-2,69)
ТБК-П, мкмоль/л после лечения	2,0 (1,77-2,46)	2,0 (1,77-2,5)	2,15 (1,8-2,62)	
АОА, ммоль/л до лечения	2,7 (2,63-3,0)	2,21 (1,34-2,58)	2,18 (2,0-2,56)	2,11 (1,87-2,56)
АОА, ммоль/л после лечения	2,91 (2,56-3,08)	2,15 (1,24-2,63)	2,24 (1,92-2,48)	

Примечания. p – достоверность различий по сравнению с данными здоровых лиц;

p• – достоверность различий по сравнению с данными до лечения.

по методу М.А. Королюка [11]. Концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-П) исследовали по методике, модифицированной В.А. Костюком [12]. Количественное определение антиоксидантной активности (АОА) в сыворотке крови проводили спектрофотометрически с помощью набора реагентов «Оксистат» производства ИБОХ НАНБ (РБ).

При статистической обработке результатов применяли программу Statistica 10.0; использовали параметрические и непараметрические методы. Сравнение изучаемых показателей с данными здоровых лиц осуществляли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между показателями до и после лечения оценивали по T-критерию Вилкоксона. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Изученные показатели про-, антиоксидантной системы крови пациентов на момент госпитализации и после проведенного лечения в различных группах представлены в таблице 1.

У пациентов 1-й и 2-й групп на момент госпитализации выявлено статистически значимое снижение активности СОД ($p=0,005$ и $p=0,01$ соответственно) относительно группы здоровых лиц. Уменьшение активности СОД приводит к избыточному образованию наиболее агрессивной формы кислородных радикалов – синглетного кислорода и рассматривается как неблагоприятный признак, который указывает на снижение неспецифической резистентности организма. Также показана тенденция к уменьшению активности каталазы (на 32,3% в 1-й группе и 38,7% во 2-й группе) и повышению концентрации ТБК-П в 1-й группе на 18%, что свидетельствует об активации процессов ПОЛ и недостаточной защите клеток от воздействия свободных радикалов у обследованных пациентов, наиболее выраженные в 1-й группе наблюдения. Значения про-, антиоксидантных показателей в крови пациентов 3-й группы на момент поступления в стационар не имели статистически значимых отличий от практически здоровых лиц.

После использования лазерной гемотерапии различных длин волн в сочетании со стандартной терапией у пациентов 1-й и 2-й групп, соответственно, выявлены возрастание активности СОД на фоне незначительного снижения концентрации ТБК-П. При этом, во 2-й группе пациентов после применения НЛОК, наблюдается статистически значимое повышение активности каталазы с 11,4 (5,7-21,3) до 27,9 (8,7-46,2) усл.ед./с*мл ($p=0,01$) по сравнению с данными до лечения. Известно, что повышение активности СОД при соответствующей активации других антиоксидантных ферментов, главным образом каталазы, является благоприятным изменением в организме из-за эффективного разложения перекиси водорода, избыточно образующейся при дисмутации супероксидного аниона, и, следовательно, оказывает цитопротективное действие.

Анализ АОА сыворотки крови у пациентов с ДЭ всех групп до и после лечения, оценивающей концентрацию водорастворимого аналога витамина Е (тролокса), который считается наиболее распространенным природным антиоксидантом, содержащимся в сыворотке и в плазматических клеточных мембранах, также оказывающим влияние на содержание продуктов ПОЛ [14], не установил достоверной разницы по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования у пациентов с хронической ишемией головного мозга были выявлены изменения в локальном пространственном распределении кальция и морфологической структуре дегидратирующих капель биожидкостей, а также снижение активности СОД в крови пациентов 1- и 2-й групп на момент госпитализации. После проведенного курсового лечения с включением ВЛОК

или НЛОК с разной длиной волн установлена тенденция к нормализации морфоструктуры дегидратирующих капилляров цельной крови, а также повышение активности основных ферментов АООС.

Список литературы / References:

1. Воскресенская О.Н., Захарова Н.Б., Иванов М.В. Механизмы формирования хронической ишемии головного мозга при артериальной гипертензии. *Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова*, 2017, № 2, с. 68-71. [Voskresenskaya O.N., Zakharova N.B., Ivanov M.V. Mechanisms of the formation of chronic cerebral ischemia in hypertension. *Zhurn. neurology and psychiatry. Korsakova*, 2017, no. 2, pp. 68-71. (In Russ.)]
2. Левин О.С., Штульман Д.Р. *Неврология. Справочник практического врача, 10 издание*. М.: «МЕДпресс-информ», 2016, с. 406-416. [Levin O.S., Shtulman D.R. *Neurology. Handbook of the Practitioner, 10th edition*. M.: "MEDpress-inform", 2016, pp. 404-416. (In Russ.)]
3. Нечипуренко Н.И. Роль кислородзависимых процессов в патогенезе хронической ишемии головного мозга. *Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа*, 2012, № 3, с. 150-159. [Nechipurenko N.I. The role of oxygen-dependent processes in the pathogenesis of chronic cerebral ischemia. *Neurology and neurosurgery. Eastern Europe*, 2012, no. 3, pp. 150-159. (In Russ.)]
4. Chen S.D., Yang D. I., Lin T.K., Shaw F.Z., Liou C.W., Chuang Y.C. Roles of oxidative stress, apoptosis, PCG-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int. J.Mol. Sci.*, 2011, vol. 12 (10), p. 7199.
5. Никитин А.В., Эльжуркаев А.А. Надвенное низкоинтенсивное лазерное излучение в комплексном лечении ишемической болезни сердца. *Вестник новых медицинских технологий*, 2013, № 1. [Nikitin A.V., Elzhurkaev A.A. Ultravascular low-intensity laser radiation in the complex treatment of coronary heart disease. *Bulletin of new medical technologies*, 2013, no. 1. (In Russ.)]
6. Нечипуренко Н.И., Степанова Ю.И., Василевская Л.А., Пашковская И.Д. *Лазерная гемотерапия при ишемических цереброваскулярных заболеваниях (экспериментальные и клинические аспекты)*. Минск: Бизнесофсет, 2010, 192 с. [Nechipurenko N.I., Stepanova Yu.I., Vasilevskaya L.A., Pashkovskaya I.D. *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 cerebral ischemia. *Health*, 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., Shatokhina S.N. *Morphology of human biological fluids*. M.: Chrysostom, 2001, 302 p. (In Russ.)]
9. Булойчик Ж.И., Зажогин А.П., Нечипуренко Н.И., Потапович М.П., Пашковская И.Д. Морфологическое и спектрофотометрическое исследование плазмы крови пациентов с аневризмой сосудов головного мозга. *Журнал БГУ. Физика*, 2018, № 1, с. 9-17. [Buloychik Zh.I., Zajogin A.P., Nechipurenko N.I., Potapovich M.P., Pashkovskaya I.D. Morphological and spectrophotometric study of the blood plasma of patients with cerebral aneurysm. *BSU Journal. Physics*, 2018, no. 1, pp. 9-17. (In Russ.)]
10. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр. мед. химии*, 1990, т. 36, № 2, с. 88-91. [Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the oxidation reaction of quercetin. *Questions of medical chemistry*, 1990, vol. 36, no. 2, pp. 88-91. (In Russ.)]
11. Королук М.А., Иванова Л.И., Майрова И.Г. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayrova I.G. Method for determination of catalase activity. *Laboratory science*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
12. Костюк В.А., Потапович А.И. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях. *Вопр. мед. химии*, 1987, № 3, с. 115-118. [Kostyuk V.A., Potapovich A.I. Determination of lipid peroxidation products using thiobarbituric acid under anaerobic conditions. *Questions of medical chemistry*, 1987, no. 3, pp. 115-118. (In Russ.)]
13. 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. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2007, no. 4, pp. 80-85. (In Russ.)]
14. Камышников В.С., Киселев П.А., Кохнович Н.Н., Орешко Н.А., Юрага Т.М. Метаболические факторы формирования патологических состояний, связанных с нарушением антиоксидантного статуса организма: методы оценки. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*, 2014, № 3, с. 116-133. [Kamyshnikov V.S., Kiselev P.A., Kokhnovich N.N., Oreshko N.A., Yuraga T.M. Metabolic factors in the formation of pathological conditions associated with a violation of the antioxidant status of the body: assessment methods. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, 2014, no. 3, p. 116-133. (In Russ.)]

**LASER ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY, MORPHOSTRUCTURAL ANALYSIS OF
DEHYDRATING DROPS OF BIOSFLUIDS AND OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH CHRONIC
BRAIN ISHEMIA IN THE TREATMENT OF LASER IRRADIATION**

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

¹ Republican research and clinical center of neurology and neurosurgery

F. Skoriny str, 24, Minsk, 220114, Belarus; e-mail: tatiananovitskaya1108@mail.ru

² Belarusian State University

Nezavisimosti Ave., Minsk, 220030, Belarus

Abstract. In this work it was found that patients at the time of admission to the hospital have changes in the local spatial distribution of calcium and the morphological structure of dehydrating drops of biofluids, which are characterized by the appearance of wide, three-beam and tourniquet cracks in whole blood and a loss of plasma symmetry. An initially low superoxide dismutase activity was detected in the blood of patients, which normalized after a course of treatment with the inclusion of intravenous or supravenuous laser irradiation of blood in addition to standard therapy.

Key words: *laser atomic emission spectroscopy, dehydration of biofluid drops, morphological structure, chronic cerebral ischemia, oxidative stress, laser hemotherapy.*

ВЛИЯНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ ИЗ ЛИЗОЦИМА НА СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO*

Венская Е.И., Лукьяненко Л.М., Скоробогатова А.С.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

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

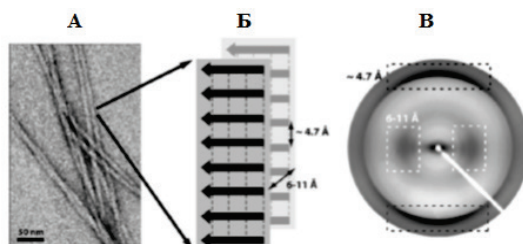
Поступила в редакцию: 10.07.20

Аннотация. В данной работе изучено влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран лимфоцитов человека в условиях окислительного стресса. Для моделирования окислительного стресса в клетках использовали трет-бутилгидроперекись (t-BHP) в конечной концентрации 1 мМ. Об изменении физико-химического состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов человека судили по параметрам флуоресценции липофильных зондов (ТМА-ДФГ, лаурдан и пирен) встраиваемых в липидный бислой мембран клеток на различной глубине. Генерацию АФК определяли с помощью флуоресцентного зонда CM-H₂DCFDA. О процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах клеток судили по концентрации малонового диальдегида (МДА). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что образованные на основе лизоцима амилоидные фибриллы вызывают модификацию липидного бислоя мембран лимфоцитов человека, проявляющуюся в изменении параметров флуоресценции липофильных зондов, встроенных в мембрану клеток, и процесса ПОЛ в ней. С другой стороны, амилоидные фибриллы при краткосрочном воздействии на лимфоциты не приводят к генерации АФК в них, но способны усиливать окислительный стресс, вызванный t-BHP. Таким образом, окислительный стресс, вызванный воздействием t-BHP, усиливается в присутствии амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, лизоцим, лимфоциты, микровязкость липидного бислоя, окислительный стресс.

Амилоидные фибриллы – это нерастворимые белковые молекулы, образующиеся в организме из нормальных белков при нарушении процессов фолдинга. Накопление амилоидов в различных органах связывают с определенными патологиями, такими как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, сосудистая деменция, эпилепсия, синдром Дауна, прионовые болезни, сахарный диабет 2 типа и системные амилоидозы [1, 2]. Амилоиды представляют собой белковые образования диаметром 6-12 нм, состоящие из β -структур неопределенной длины. С помощью электронной микроскопии было показано, что они имеют вид неразветвленных нитей (рисунок 1, А), в которых повторяющиеся поперечные β -сшивки обеспечивают характерный рисунок при двумерной рентгеновской дифракции (рисунок 1Б, 1В).

Универсальной характеристикой всех амилоидных белков является формирование поперечных β -структур. Однако стоит отметить, что амилоидные структуры *in vivo* организованы сложнее, так как состоят не из одного, а из нескольких белковых полимерных тяжей, которые называются протофиламентами, связанными между собой водородными связями [4]. Помимо уникальной структуры, амилоидные фибриллы характеризуются также рядом уникальных физических свойств. Среди них наиболее важные – это способность связывать аффинный к β -слоям краситель конго-красный [5], устойчивость к ионным детергентам [6], а также способность связывать флуоресцентные красители тиофлавин Т и тиофлавин S [7]. На сегодняшний день уже не вызывает сомнений участие амилоидных структур в развитии некоторых патологий. Известно, что некоторые из амилоидов обладают инфекционными свойствами. Образованные при нарушении процесса фолдинга из различных белков амилоиды способны накапливаться в организме, приводя к нарушениям в органах и тканях, но до сих пор остается открытым вопрос о механизмах развития патологических процессов при действии амилоидных фибрилл. С одной стороны – показана цитотоксичность определенных амилоидных белков, а с другой – не раскрыты механизмы их



А – Трансмиссионная электронная микроскопия, Б – Схематическое изображение поперечных β -сшивок в фибрилле; пунктиром обозначены водородные связи, В – типичная дифракционная картина фибрилл

Рисунок 1. Структура амилоидных фибрилл [3]

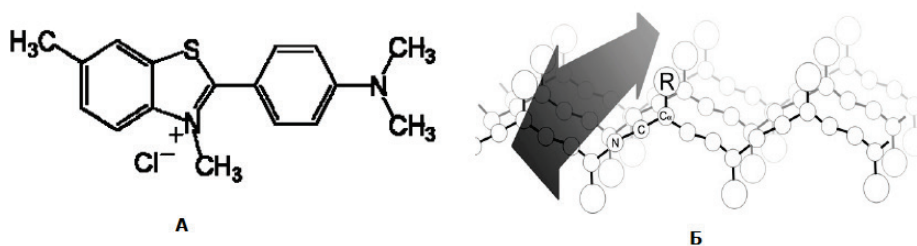


Рисунок 2. Химическая структура тиафлавина Т (А) и модель связывания с амилоидными структурами (Б) [9]

влияния на клетки. Считается, что одним из звеньев патологических процессов при нейродегенеративных заболеваниях является окислительный стресс. Цель данной работы – изучить влияние амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима, на состояние липидного бислоя мембран лимфоцитов человека в условиях окислительного стресса, вызванного t-BHP. В данной работе эксперименты были выполнены на лимфоцитах человека, так как они являются основными клетками иммунной системы, чутко реагируют на внешние агенты, уничтожают чужеродные и пораженные клетки собственного организма.

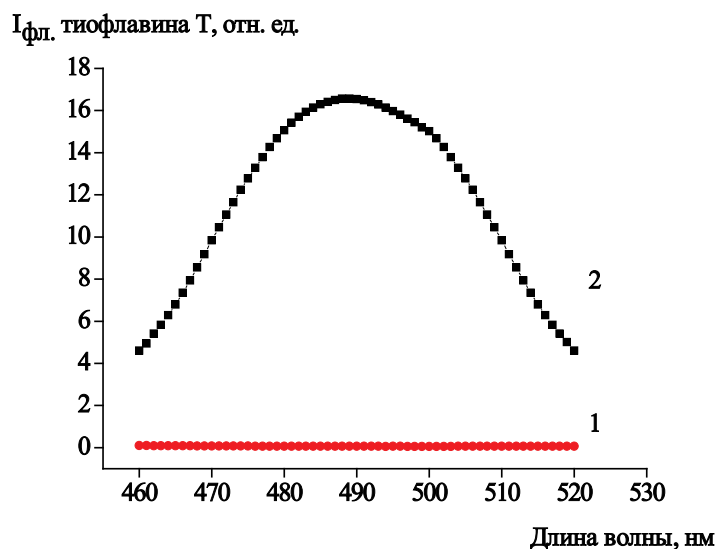
Лимфоциты выделяли в градиенте плотности гистобака при 1500 об/мин из периферической донорской крови, полученной в РНПЦ «Трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ. Количество клеток и их жизнеспособность оценивали с помощью трипанового синего в камере Горяева в световом микроскопе. Клетки разводили в PBS-буфере до концентрации 1 млн/мл. Амилоидные фибриллы получали из лизоцима куриного яйца в растворе соляной кислоты при 62°C и непрерывном перемешивании. Процесс образования фибрилл контролировали спектрофлуориметрическим методом, используя краситель тиафлавин Т. Уровень АФК регистрировали флуоресцентным методом с помощью зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA). Изменение физико-химического состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов человека изучали с помощью липофильных флуоресцентных зондов N,N,N-триметил-4-(6-фенил-1,3,5-гексатриен-1-ил) фениламмония p-толуолсульфоната (ТМА-ДФГ), 6-додеканоил-N,N-диметил-2-нафтиламина (лаурдана) и пирена. О процессах ПОЛ в мембранах клеток судили по концентрации МДА. Измерение параметров зондовой флуоресценции проводили на люминесцентном спектрофотометре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь), концентрацию МДА определяли на спектрофлуориметре Specord M-40 (Германия).

Флуоресцентный зонд тиафлавин Т широко используется в качестве маркера образования амилоидных β-слоев, так как он позволяет определить формирование поперечных сшивок β-слоя в процессе сборки амилоидных фибрилл [8]. Молекула красителя состоит из бензтиазольного и аминокбензольного колец, свободно вращающихся вокруг общей С–С связи. Причиной возрастания интенсивности флуоресценции тиафлавина Т при его связывании с амилоидными фибриллами является жесткость окружения, препятствующая повороту бензтиазольного и аминокбензольного колец молекулы друг относительно друга в возбужденном состоянии [9]. Химическая структура тиафлавина Т (А) и модель его связывания с амилоидными фибриллами (Б) представлены на рисунке 2.

При взаимодействии тиафлавина Т с амилоидными фибриллами происходит увеличение интенсивности флуоресценции красителя. В таблице 1 представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции тиафлавина Т в процессе инкубации раствора лизоцима в 10 mM HCl в концентрации 20 мг/мл при комнатной температуре (контроль) и раствором лизоцима при 62° С и постоянном перемешивании для получения амилоидных фибрилл. Как видно из таблицы 1, интенсивность флуоресценции зонда увеличивалась в течение первых 5 дней инкубации с выходом на плато к шестым суткам, что позволяло сделать вывод об образовании

Таблица 1. Зависимость интенсивности флуоресценции тиафлавина Т от времени инкубации лизоцима, характеризующая образование амилоидных фибрилл

Время инкубации, часы	I _{фл.} тиафлавина Т, отн. ед.	
	Контроль (раствор лизоцима в соляной кислоте при комнатной температуре)	Опыт (раствор лизоцима в соляной кислоте при 62°C и непрерывном перемешивании)
0	0,064 ± 0,0031	0,058 ± 0,0018
24	0,072 ± 0,0038	1,839 ± 0,13
48	0,075 ± 0,0041	1,755 ± 0,11
72	0,112 ± 0,0056	6,515 ± 0,37
96	0,108 ± 0,0061	10,230 ± 0,59
120	0,095 ± 0,0048	15,031 ± 0,88
144	0,090 ± 0,0057	15,827 ± 1,007



1 — контроль (нативный лизоцим)

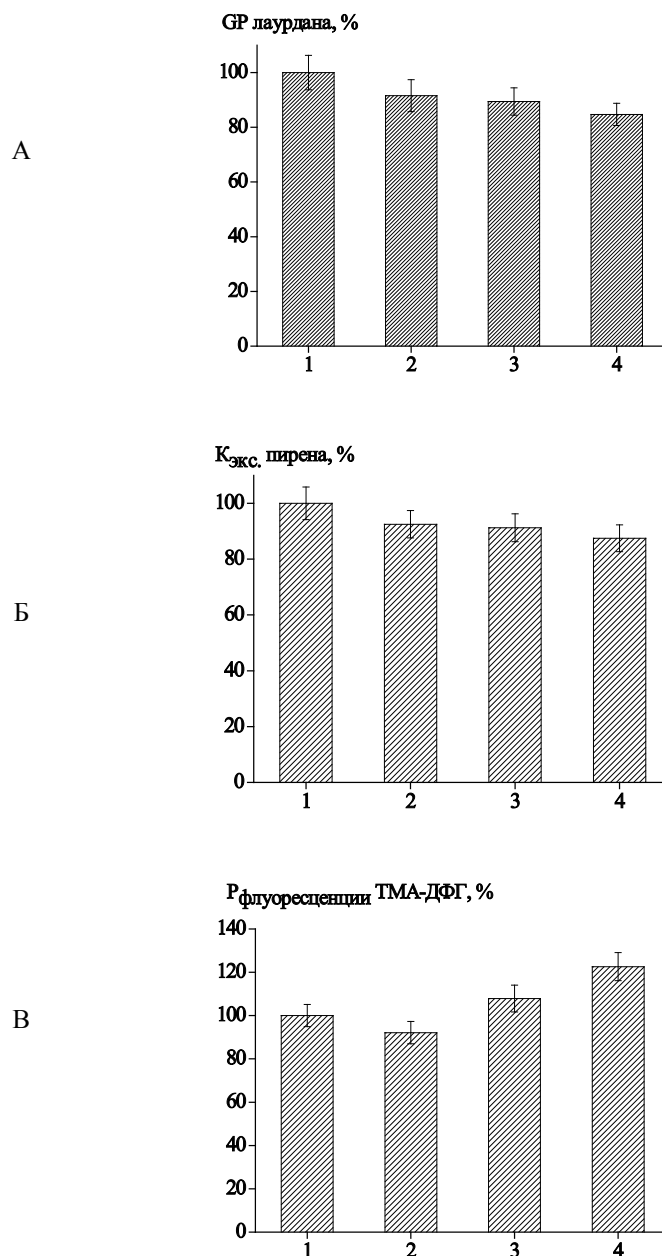
Рисунок 3. Спектр флуоресценции тиафлавина Т, связанного с полученными из лизоцима амилоидными фибриллами (2) ($\lambda_{возб.} = 435$ нм)

зрелых амилоидных фибрилл. Интенсивность флуоресценции зонда в контрольном образце не изменялась (табл. 1). На рисунке 3 представлен типичный спектр флуоресценции тиафлавина Т в растворе амилоидных фибрилл из лизоцима (2) по сравнению с нативным лизоцимом (1).

Полученные в течение 5-6 суток инкубации зрелые амилоидные структуры из лизоцима были использованы для проведения экспериментов.

В многочисленных исследованиях показано, что амилоидные фибриллы в организме человека в первую очередь взаимодействуют с клеточными мембранами. В результате такого взаимодействия изменяются структура и свойства мембран, и запускается каскад событий, приводящих к гибели клеток, однако механизм ее не изучен. Изменение структуры мембран под действием амилоидных фибрилл включает несколько процессов, таких как образование каналов или пор, повышение проницаемости, активация рецепторов, окисление мембранных липидов и белков. [10]. Известно, что отложения β -амилоидного белка нарушают целостность плазматических мембран [11]. Важным показателем состояния клеток является микровязкость их липидного бислоя. Группой итальянских ученых с помощью флуоресцентных зондов ТМА-ДФГ и ДФГ было показано, что у пациентов на ранних стадиях болезни Альцгеймера изменяется микровязкость липидных рафтов в различных областях головного мозга, при этом, изменения зависят от тяжести заболевания и области головного мозга [12]. Для того, чтобы оценить влияние амилоидных фибрилл на микровязкость липидного бислоя мембран лимфоцитов мы изучали показатели флуоресценции липофильных зондов, встроенных в мембраны лимфоцитов, после предварительной их инкубации в течение 60 мин при 37°C в PBS-буфере, содержащем амилоидные фибриллы и/или t-BHP. Лаурдан позволяет оценить упорядоченность фосфолипидов мембраны, так как он взаимодействует с фосфолипидами на границе гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя и чувствителен к наличию и подвижности растворенных диполей [13]. Было обнаружено, что инкубация лимфоцитов человека в течение 60 минут в среде, содержащей амилоидные фибриллы из лизоцима (концентрация белка 5 мкг/мл), а также t-BHP (1 мМ) приводит к снижению генерализованной поляризации лаурдана. Наиболее выражено данный эффект наблюдался в клетках, проинкубированных с амилоидными фибриллами совместно с t-BHP, и достигал в среднем 14% по сравнению с контрольными значениями (рис. 4, А). Для оценки состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов также используется метод, основанный на образовании эксимеров пирена. В наших экспериментах коэффициент эксимеризации пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов, снижался при воздействии на них амилоидных фибрилл и t-BHP на 12,5% (рис. 4, Б). С помощью флуоресцентного зонда ТМА-ДФГ мы оценивали изменение микровязкости наружной области липидного бислоя мембран лимфоцитов, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл и t-BHP. Показано, что в присутствии амилоидных фибрилл поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны лимфоцитов, незначительно снижалась, при воздействии t-BHP — повышалась на 8%, а при сочетанном воздействии амилоидных фибрилл и t-BHP данный показатель повышался в среднем на 23% по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, В).

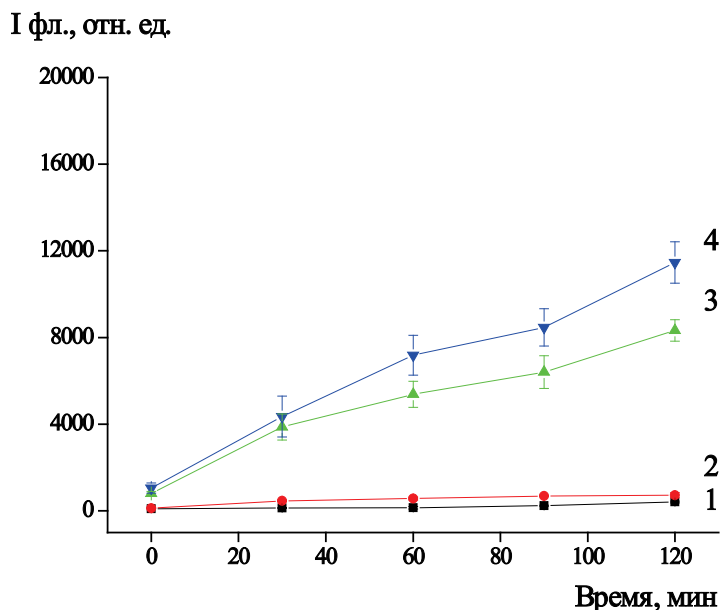
Одним из возможных механизмов токсического воздействия амилоидов на клетки считают развитие окислительного стресса. Для того, чтобы изучить влияние амилоидных фибрилл на процесс генерации АФК в лимфоцитах человека, мы использовали флуоресцентный зонд CM-H₂DCFDA. Известно, что данный зонд проникает в клетки и там гидролизует до неактивной формы DCFH, которая окисляется в присутствии внутриклеточных АФК и флуоресцирует. Измеряя кинетику флуоресценции данного зонда, можно изучать



1 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4 (контроль);
 2 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима;
 3 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ t-BHP;
 4 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы и t-BHP

Рисунок 4. А – генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана, встроенного в мембраны лимфоцитов человека после воздействия на них амилоидных фибрилл и t-BHP; Б – коэффициент эксимеризации пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов человека после воздействия на них амилоидных фибрилл и t-BHP; В – поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны лимфоцитов человека после воздействия на них амилоидных фибрилл и t-BHP

общий уровень окислительных процессов в живой клетке [14]. При исследовании влияния амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима, на процесс генерации АФК в лимфоцитах человека нами было обнаружено, что после 120 мин инкубации клеток в PBS-буфере, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима (5 мкг/мл) интенсивность флуоресценции окисленной формы зонда не увеличивалась по сравнению с контрольными значениями клеток, проинкубированными при тех же условиях без белковых примесей. При воздействии на клетки t-BHP наблюдалось увеличение генерации АФК, однако максимальное увеличение флуоресценции зонда обнаружено в образцах, проинкубированных с амилоидными фибриллами и t-BHP на 33-38% (рис. 5).



- 1 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4 (контроль);
 2 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима;
 3 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ t-BHP;
 4 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы и t-BHP

Рисунок 5. Интенсивность флуоресценции окисленной формы CM-H₂DCFDA в лимфоцитах при воздействии на них амилоидных фибрилл и t-BHP в зависимости от времени инкубации

Аналогичный эффект наблюдался при исследовании процесса ПОЛ в мембранах лимфоцитов: после инкубации клеток 60 мин при 37°C при сочетанном воздействии амилоидных фибрилл и t-BHP наблюдалось увеличение уровня МДА в среднем на 35% по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, амилоидные фибриллы способны усиливать окислительный стресс, вызванный t-BHP.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что при воздействии на лимфоциты человека амилоидных фибрилл из лизоцима *in vitro* не происходит образования АФК в клетках, но в присутствии амилоидов усиливается окислительный стресс, вызванный t-BHP. В дальнейшем, на фоне окислительного стресса происходит изменение физико-химического состояния липидного бислоя мембран клеток. Наблюдается изменение микровязкости липидного бислоя, происходит увеличение степени упорядоченности фосфолипидных цепей и ускорение процесса ПОЛ. Полученные результаты позволяют предположить, что в механизмах токсического действия амилоидных фибрилл на клетки задействованы процессы генерации активных форм кислорода, инициированные ксенобиотиками.

Список литературы / References:

1. Chiti F., Dobson C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, vol. 86, no. 35, pp. 1-35.42
2. Мальцев А.В., Галзитская О.В. Образование и участие нано-амилоидов в патогенезе болезни Альцгеймера и других амилоидогенных заболеваний. *Биомедицинская химия*, 2010, т. 56, вып. 6, с. 624-638. [Mal'cev A.V., Galzitskaya O.V. Obrazovanie i uchastie nano-amiloidov v patogeneze bolezni Al'cgejmera i drugih amiloidogennyh zabolevanij. *Biomedicinskaya himiya*, 2010, vol. 56, iss. 6, pp. 624-638. (In Russ.)]
3. Tycko R., Wickner R.B. Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Acc. Chem. Res.*, 2013, vol. 46, pp. 1487-1496.
4. Fitzpatrick A.W., et al. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, pp. 5468-5473.
5. Steensma D.P. "Congo" red. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2001, vol. 125, pp. 250-252.
6. Alberti S., et al. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell*, 2009, vol. 137, pp. 146-158.
7. Нижников А.А., Антонен К.С., Инге-Вечтомов С.Г. Амилоиды: от патогенеза к функции. *Биохимия*, 2015, т. 80, вып. 9, с. 1356-1375. [Nizhnikov A.A., Antonen K.S., Inge-Vechtomo S.G. Amiloidy: ot patogeneza k funkicii. *Biokhimiya*, 2015, vol. 80, iss. 9, pp. 1356-1375. (In Russ.)]

8. LeVine H. 3rd Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 1993, vol. 2, no. 3, pp. 404-410.
9. Krebs M.R., Bromley E.N., Donald A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct Biol.*, 2005, no. 149 (1), p. 30-7.
10. Huang B., He J., Ren J., Yan X.Y., Zeng C.M. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48 (25), pp. 5794-800. DOI: 10.1021/bi900219.
11. Kubánková M., López-Duarte I. Kiryushko D., Kuimova M.K. Molecular rotors report on changes in live cell plasma membrane microviscosity upon interaction with beta-amyloid aggregates. *Soft Matter*, 2018, vol. 14 (46), pp. 9466-9474. DOI: 10.1039/c8sm01633j.
12. Díaz M., Fabelo N., Martín V., Ferrer I., Gómez T., Marín R. Biophysical alterations in lipid rafts from human cerebral cortex associate with increased BACE1/A β PP interaction in early stages of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2015, vol. 43 (4), pp. 1185-98. DOI: 10.3233/JAD-141146.PMID: 25147112.
13. Harris F.M., Best K.B., Bell J.D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta.*, 2002, vol. 1565 (1), pp. 123-128.
14. Wojtala A., Bonora M., Malinska D., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. *Methods in enzymology*, 2014, vol. 542, pp. 243-262. DOI: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3.

THE EFFECT OF AMYLOID FIBRILS FROM LYSOZYME ON THE LIPID BILAYER OF HUMAN LYMPHOCYTES UNDER THE CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

Venskaia E., Lukyanenko L., Skarabaha A.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus

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

Abstract. The aim of this work is the investigation of the effect of amyloid fibrils on the physical and chemical state of the lipid bilayer of human lymphocytes membrane under the conditions of oxidative stress. Also, the process of reactive oxygen species (ROS) in human lymphocytes after amyloid fibril influence was studied. Tert-butyl hydroperoxide (t-TBH) in the final concentration 1 mM was used for oxidative stress modeling. Changes of lipid bilayer were studied using lipophilic fluorescent probes (TMA-DPH, laurdan, pyrene) which incorporated into the membrane lipid bilayer at different depths. ROS generation was measured with the help of the fluorescent probe CM-H₂DCFDA. Process of lipid peroxidation (LP) in the cell membrane judged by the concentration of the malondialdehyde (MDA). Obtained results indicate that lysozyme based amyloid fibrils lead to the lipid bilayer modification which manifested as changes of fluorescent parameters of lipophilic probes incorporated into the cells membrane and process of LP. At the same time, short term exposure of amyloid fibrils does not stimulate ROS generation in the lymphocytes but intensify oxidative stress generated by t-TBH. Consequently, amyloid fibrils from lysozyme increase oxidative stress generated by t-TBH.

Key words: amyloid fibrils, lysozyme, lymphocytes, microviscosity of lipid bilayer, oxidative stress.

ПОИСК *INSILICO* ВОЗМОЖНЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ С НОСИТЕЛЯМИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Панкова С.М.¹, Сакибаев Ф.А.¹, Королева В.А.^{1,2}, Олшанникова С.С.¹, Холявка М.Г.^{1,3},
Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет

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

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394036, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

³ Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 11.07.20

Аннотация. Исследованы состав и расположение заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков молекул трипсина из *Bos taurus* и коллагеназы из *Clostridium histolyticum*. Определено процентное соотношение аминокислот разных типов на поверхности энзимов. Установлено, что заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки распределены по поверхности молекул неравномерно, образуя участки локального скопления. Выдвинуто предположение о том, что наиболее перспективными носителями для иммобилизации изученных нами протеаз являются гидрофобные полимерные материалы, которые, вероятно, будут взаимодействовать с одним из участков на поверхности молекул ферментов.

Ключевые слова: трипсин из *Bos taurus*, коллагеназа из *Clostridium histolyticum*, сайты связывания, заряженные аминокислотные остатки, гидрофобные аминокислотные остатки

Несмотря на значительное число работ, посвященных получению биопрепаратов с протеолитической активностью, в клиническую практику из них введены единицы, поэтому разработка новых методов иммобилизации протеаз остается актуальной проблемой биологии и медицины. Известно, что для иммобилизованных ферментов число возможных инактивирующих механизмов существенно меньше, чем в случае растворимых белков. Молекулы энзима могут связываться с носителями, на поверхности которых имеются заряженные, гидрофобные, полярные группы, за счет относительно слабых электростатических и гидрофобных взаимодействий, а также водородных связей [1].

Трипсин (КФ3.4.21.4) – фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью. Трипсин синтезируется в поджелудочной железе в виде неактивного предшественника (профермента) трипсиногена. Молекулярная масса трипсина составляет от 23,29 до 24 кДа. Молекула бычьего трипсина состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, и содержит 6 дисульфидных связей [2-4]. Трипсин используют для изготовления лекарств. Препараты трипсина обладают противовоспалительным и противоотечным действием (при внутривенном и внутримышечном введении); способны избирательно расщеплять ткани, подвергшиеся некрозу. В медицине трипсин применяют для лечения ран, ожогов, тромбозов, часто в сочетании с другими ферментами и антибиотиками [5].

Коллагеназа (К.Ф. 3.4.4.19) – фермент, способный гидролизовать коллаген при физиологических значениях pH и температуры. Молекулярная масса фермента составляет от 50 до 120 кДа. Коллагеназу выделяют все штаммы *Clostridium histolyticum* [6]. Коллагеназа гидролизует нативный и денатурированный коллаген, но не действует на обычные глобулярные белки (казеин, гемоглобин, альбумины) и фибриллярные белки (фибрин, кератин, эластин). Таким образом, коллагеназа проявляет весьма узкую субстратную специфичность при действии на белки. На основании работ с синтетическими пептидами установлено, что коллагеназа гидролизует субстраты, имеющие следующее строение: X – P – R¹ – Гли – P – Y (стрелкой показана гидролизуемая связь), где P – остатки пролина или оксипролина, R, X, Y – остатки других аминокислот. Следовательно, основное требование, предъявляемое коллагеназой к строению субстрата – присутствие остатков пролина или оксипролина в определенном положении относительно чувствительной связи [7-9]. Бактериальная коллагеназа может быть использована в диагностических и лабораторных целях: для удаления некротических тканей из ран, лечения заболеваний глаз, операционных спаек, для профилактики морщин, ускорения рассасывания швов и рубцовых образований. Наиболее перспективным методом в лечении контрактуры Дюпюитрена – заболевания кисти, связанного с рубцовым перерождением и укорачиванием ладонных сухожилий, является использование коллагеназы. Инъекции коллагеназы в зарубцевавшуюся фасцию, покрывающую сухожилие, приводят к ее распаду и, как следствие, к исчезновению рубца [10,11].

Одна из наиболее перспективных задач современной медицинской биотехнологии – создание биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов для использования в лечебных и фармацевтических целях. Использование метода адсорбционной иммобилизации в наибольшей степени способствует сохранению нативной структуры молекул и высокого уровня их каталитической активности за счет отсутствия химической модификации энзимов [12].

Целью нашей работы было выявление потенциальных сайтов связывания с заряженными и гидрофобными носителями на поверхности молекул трипсина из *Bos taurus* (PDB ID: 5T3H) и коллагеназы из *Clostridium histolyticum* (PDB ID: 4ARE).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение аминокислотных остатков на поверхности молекул трипсина и коллагеназы с доступностью для растворителя не менее 20 % проводили с использованием программы Swiss-PdbViewer 4.1.0. Локализацию гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков визуализировали с помощью программы Maestro 10.3.

Расстояние между ближайшими атомами аминокислотных остатков (r) вычисляли на основе их координат по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2},$$

Аналогичным способом были рассчитаны расстояния от активного центра трипсина и коллагеназы до заряженных и гидрофобных аминокислот на поверхности ее молекулы.

Критерием группировки аминокислотных остатков в локальное скопление служила степень их удаленности друг от друга. Остатки были отнесены нами к одному скоплению в случае, если среднее расстояние от каждого из них до трех ближайших аминокислот из определяемого скопления не превышало 10 Å. За начальное положение локального скопления принимали три аминокислотных остатка, среднее расстояние между которыми также не превышало 10 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности молекулы коллагеназы обнаруживается 254 аминокислотных остатка, трипсина – 85, доступных для растворителя не менее чем на 20 %. Среди них преобладают полярные незаряженные остатки. Количество гидрофобных аминокислот превышает число заряженных аминокислот, расположенных на поверхности энзима. Абсолютное и относительное количество остатков аминокислот представлено в таблицах 1 и 2.

Анализ модели пространственной структуры трипсина показал, что аминокислотные остатки на поверхности молекулы распределены неравномерно. На поверхности глобулы обнаружено двенадцать положительно заряженных аминокислот, при этом некоторые аминокислотные остатки образуют участки скопления положительного заряда. Первый участок образован –Lys87 и Lys109, второй – His57 и Lys60, третий – Lys222 и Lys224. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки располагаются относительно равномерно по поверхности молекулы (рис. 1).

Анализ модели пространственной структуры коллагеназы показал, что остатки заряженных аминокислот на поверхности молекулы распределены неравномерно, образуя девять областей скопления. Первое скопление образовано преимущественно аминокислотными остатками Lys, His, Asp, Glu; второе – Lys, His, Arg, Glu, Asp; третье – Lys, Arg, Asp; четвертое – Lys, Arg, Glu, Asp; пятое-девятое – Lys, Glu, Asp. (рис. 2).

На рисунке 3 представлено расположение гидрофобных аминокислот на поверхности трипсина, где первое скопление образовано Tyr59, Val90, Pro92; второе – Gly62, Gly38, Tyr39, Val75, Val76, Phe82, Gly148, Tyr151; третье – Gly19, Leu185, Gly187. Гидрофобные остатки коллагеназы распределены относительно неравномерно и образуют скопления, что, возможно, увеличит площадь связывания фермента с носителем (рис. 4).

Ширина молекулы трипсина составила 38.11 Å, длина – 50.46 Å, высота – 41.66 Å (рис. 5). Следовательно, минимальный размер пор носителя для адсорбционной иммобилизации фермента в его порах соответствует 51 Å, а максимальный размер пор в матрице полимера для создания на его основе микрокапсул – 37 Å.

Таблица 1. Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков на поверхности молекулы коллагеназы

Тип остатков	Абсолютное количество	Относительное количество
Гидрофобные	64	25 %
Положительно заряженные	58	23 %
Отрицательно заряженные	53	21 %
Незаряженные	79	31 %

Таблица 2. Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина

Тип остатков	Абсолютное количество	Относительное количество
Гидрофобные	26	30,5 %
Положительно заряженные	12	14,0 %
Отрицательно заряженные	4	5,0 %
Незаряженные	43	50,5 %

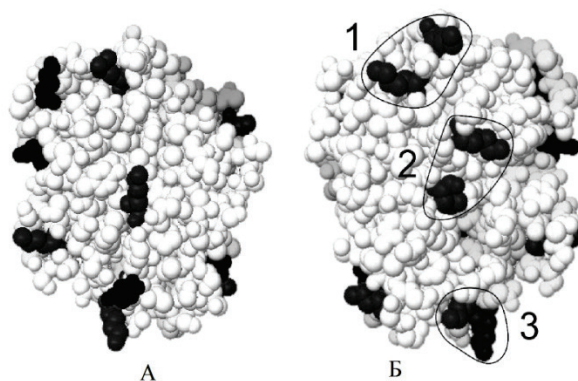


Рисунок 1. Локальные скопления (1-3) заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно): Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

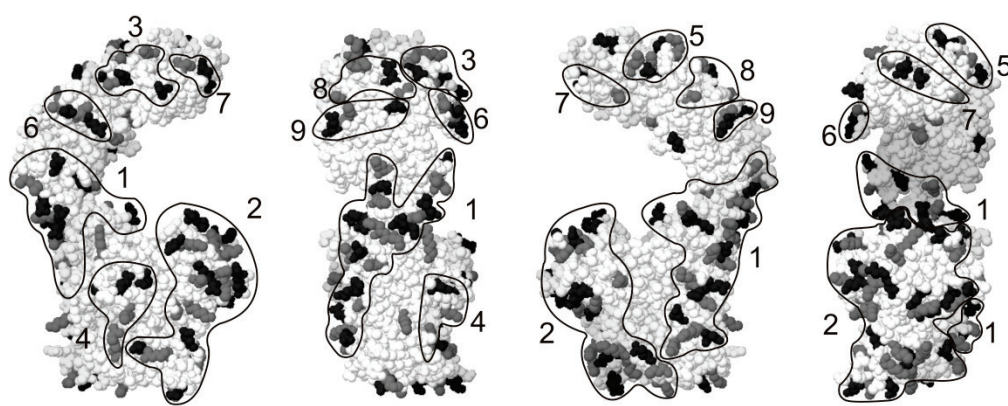


Рисунок 2. Локальные скопления (1-9) заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы коллагеназы (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно). Слева направо представлены развернутые на 90 градусов вокруг вертикальной оси изображения модели фермента

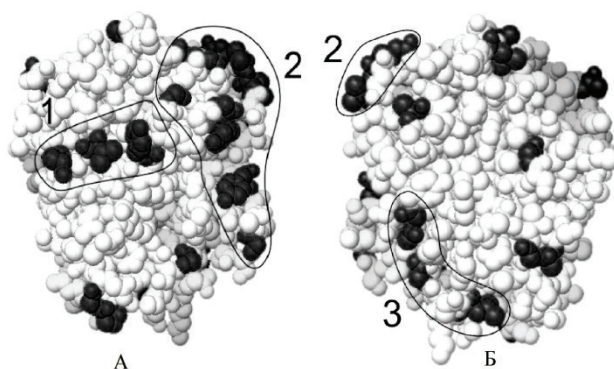


Рисунок 3. Локальные скопления (1-3) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина: Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

Для молекулы коллагеназы из *Clostridium histolyticum* максимальные значения ширины составили 54.97 Å, длины – 71.68 Å, высоты – 109.23 Å (рис. 6). Из этих данных следует, что минимальный размер пор носителя для адсорбционной иммобилизации энзима в его порах соответствует ~ 110 Å, а максимальный размер пор в матрице полимера для создания на его основе микрокапсул ~ 50 Å.

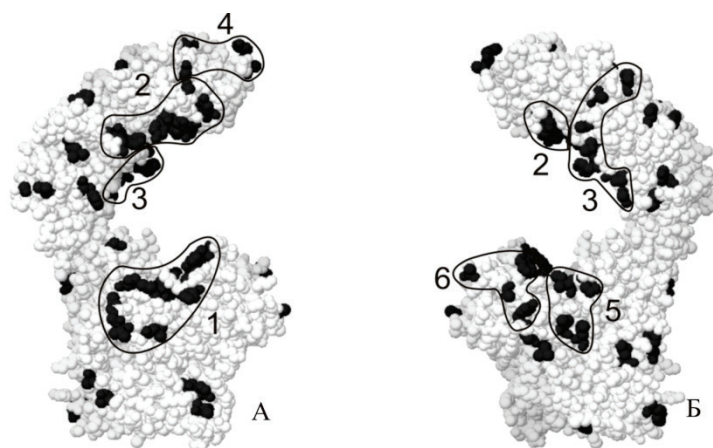


Рисунок 4. Локальные скопления (1-6) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы коллагеназы: Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

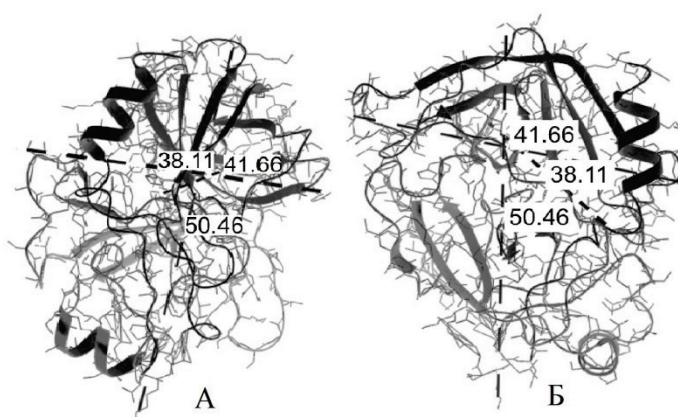


Рисунок 5. Размер молекулы трипсина, где Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

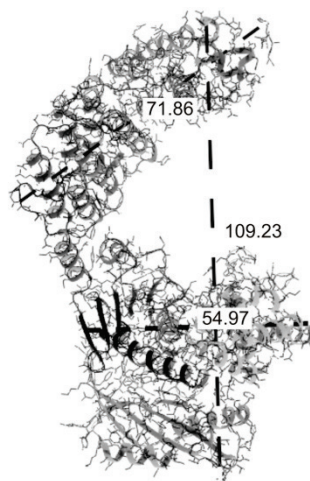


Рисунок 6. Размеры молекулы коллагеназы

На основании приведенных данных можно сделать вывод о том, что наиболее устойчивым будет связывание трипсина и коллагеназы с гидрофобными носителями, поскольку для таковых имеется наибольшее количество сайтов связывания в виде гидрофобных аминокислотных остатков. Среди заряженных носителей, вероятно, наиболее стабильный комплекс с трипсином будут образовывать агенты с отрицательно заряженными матрицами, поскольку в данных случаях среди заряженных остатков преобладают заряженные положительно. Однако при разработке гетерогенных катализаторов на основе представленных в работе ферментов необходимо, помимо стабильности комплекса, также учитывать локализацию аминокислот на поверхности молекул белков, в том числе их положение относительно активного центра фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

Список литературы / References:

1. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Имобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение. Издательский дом ВГУ: Воронеж, 2017, 261 с. [Kholyavka M.G., Artyukhov V.G. *Immobilized biological systems: biophysical aspects and practical application*. Voronezh State University Publishing House: Voronezh, 2017, 261 p. (In Russ.)]
2. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971, 404 с. [Mosolov V.V. *Proteolytic enzymes*. M.: Nauka, 1971, 404 p. (In Russ.)]
3. Wu P., Weisell J., Pakkala M., Peräkylä M., Zhu L., Koistinen R., Koivunen E., Stenman U., Närvänen A., Koistinen H. Identification of Novel Peptide Inhibitors for Human Trypsins. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 391, no. 2-3. DOI: 10.1515/bc.2010.030.
4. Torbica A.M. Advantages of the Lab-on-a-Chip Method in the Determination of the Kunitz Trypsin Inhibitor in Soybean Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, no. 13. DOI: 10.1021/jf100830m.
5. Jesus-de la Cruz K., Alvarez-Gonzalez C.A., Pena E., Morales-Contreras J.A., Avila-Fernandez A. Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production. *Journal of Biotech*, 2018, vol. 8. DOI: 10.1007/s13205-018-1208-0.
6. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Journal of Nature Structural and Molecular Biology*, 2011, vol. 18, no. 10. DOI: 10.1038/nsmb.2127.
7. Конон А.Д., Петровский С.В., Шамбунова М.Ю., Уварова А.В., Козлова Ю.О., Григорьева М.В., Москвичев Б.В. Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ – перспективных ферментов медицинского назначения. *Медицина экстремальных ситуаций*, 2016, № 2 (56). [Konon A.D., Petrovsky S.V., Shamburova M.Yu., Uvarova A.V., Kozlova Yu.O., Grigoryeva M.V., Moskvichev B.V. Features of biotechnology of clostridial collagenases – promising enzymes for medical purposes. *Emergency medicine*, 2016, no. 2 (56). (In Russ.)]
8. Hu Y., Webb E., Singh I., Morgan B.A., Gainor J.A., Gordon T.D., Siahaan T.J. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277. DOI: 10.1074/jbc.M111042200.
9. Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Структурно-функциональные особенности и свойства метцинкинов. *Биохимия*, 2012, т. 77, № 2. [Balaban N.P., Rudakova N.L., Sharipova M.R. Structural and functional features and properties of metzinkins. *Biochemistry*, 2012, vol. 77, no. 2. (In Russ.)]
10. Eckhard U., Nu D., Ducka P., Scho E., Brandstetter H. Crystallization and preliminary X-ray characterization of the catalytic domain of collagenase G from *Clostridium histolyticum*. *Journal of Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2008, vol. 64, no. 5. DOI: 10.1107/S1744309108010476.
11. Bauer R., Jeffrey J., Philominathan S.T.L., Davis D., Matsushita O., Sakona J. Structural comparison of ColH and ColG collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum*. *Journal of bacteriology*, 2013, vol. 195, no. 2. DOI: 10.1128/JB.00010-12.
12. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М. Исследование процессов УФ-модификации свободного и иммобилизованного трипсина. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 1. [Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M. Investigation of the processes of UV modification of free and immobilized trypsin. *Radiation biology. Radioecology*, 2017, vol. 57, no. 1. (In Russ.)]

SEARCH IN SILICO OF POSSIBLE LINK SITES WITH CARRIER AT IMMOBILIZATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES

Pankova S.M.¹, Sakibaev F.A.¹, Koroleva V.A.^{1,2}, Olshannikova S.S.¹, Holyavka M.G.^{1,3}, Artyukhov V.G.¹

¹ Voronezh State University

Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: sazykina.93@mail.ru

² N.N. Burdenko Voronezh State Medical University

st. Student, 10, Voronezh, 394036, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

³ Sevastopol State University

st. Universitetskaya, 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

Abstract. The composition and location of charged and hydrophobic amino acid residues of trypsin from *Bos taurus* and collagenase from *Clostridium histolyticum* were studied. The percentage ratio of different types of amino acids on the surface of enzymes was determined. It was established that charged and hydrophobic amino acid residues are distributed unevenly on the surface of the molecules, forming sections of a local cluster. It has been suggested that the most promising carriers for the immobilization of the proteases we studied are hydrophobic polymeric materials, which are likely to interact with one of the sites on the surface of enzyme molecules.

Key words: trypsin from *Bostaurus*, collagenase from *Clostridium histolyticum*, binding sites, charged amino acid residues, hydrophobic amino acid residues.

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДОВ КОЖНОГО СЕКРЕТА БЕЗЧЕШУЙЧАТОГО ВИДА РЫБ

Меркулова Н.Л.¹, Грехнева Е.В.¹, Чуйкова С.В.², Малышев В.Н.²

¹ Курский государственный университет

ул. Радищева, 33, г. Курск, 305000, РФ; e-mail: grekhnyovaev@yandex.ru

² ООО «Акватехнологии»

ул. Малиновая, 66, г. Курск, 305023, РФ

Поступила в редакцию: 11.07.20

Аннотация. В данной работе осуществлено выделение и анализ пептидной фракции секреторной жидкости клария угревидного (*Clarias gariepinus*). Выделение осуществлялось методами переосаждения и сопровождалось промежуточными очистками на сорбентах. Пептидная природа выделенной фракции подтверждалась методом ИК-спектроскопии. Масс-спектрометрический анализ пептидной фракции экстракта секреторной жидкости показал, что в составе преобладают хорошо удерживаемые пептиды с молекулярной массой 2000-3000 Да, а также более короткие гидрофильные пептиды. Последовательности пептидов определяли с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer 1.4. (Thermo Scientific) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей UniProt (uniprot-catfish+AND+organism__Clarias+gariepinus+[13013]). Программно было найдено 14547 пептидных последовательностей, относящихся к 131 группе белков. Показано, что экстракт секреторной жидкости содержит большое количество пептидов, относящихся к различным классам белков протеома *Clarias gariepinus* (бета-актины, семейство цитохрома, белки теплового шока, миостатин, НАДН-дегидрогеназный комплекс и др.), которые определяют широкий набор биологических свойств, характерных для кожного секрета рыбы. Дальнейшее изучение кожного секрета клария угревидного представляется перспективным в плане фракционирования пептидного пула и определения фармакологической активности более узких фракций.

Ключевые слова: кларий угревидный, кожный секрет, пептидные фракции, масс-спектрометрия, секвенирование.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время активно ведется поиск новых полипептидных препаратов, обладающих биологической активностью. Изучение и систематизация защитных пептидов живых организмов начались сравнительно недавно [1], тем не менее, на их основе уже созданы фармацевтические композиции. Такие препараты представляют собой, как правило, смесь олигопептидов, выделенных из различных тканей и органов животных. К уже известным и широко применимым лекарственным средствам относятся тималин, кортексин, церебролизин, актовегин, солкосерил и др. отечественных и зарубежных производителей. Указанные препараты, как заявляют производители, обладают иммуномодулирующими свойствами, стимулируют процессы регенерации и кроветворения, улучшают течение процессов клеточного метаболизма, проявляют антиагрегационную и противоопухолевую активность, оказывают нейротрофический, нейропротективный, ноотропный, противовоспалительный, антиконвульсанный и противоопухолевый эффекты. Процесс выделения таких пептидов отличается высокой трудоемкостью, длительностью и дороговизной.

При этом недостаточно внимания, по нашему мнению, уделяется изучению свойств и состава органов и тканей рыбы. Особенный интерес в этом плане могут представлять бесчешуйчатые виды рыб, в частности африканский клариевый сом или кларий угревидный (*Clarias gariepinus*). Особенностью данного вида является то, что, не обладая механической защитой в виде чешуи, сом вырабатывает на поверхности кожи секрет, призванный выполнять многочисленные защитные функции [2-4].

Слизь играет огромную роль в жизнеобеспечении всех видов рыбы: она обеспечивает механическую защиту путем уменьшения трения тела о воду, предотвращает попадание в организм паразитов и бактерий (бактерицидная защита), ускоряет свертывание крови в случаях ранений (гемостатическая функция) [5], интенсифицирует обмен веществ, осуществляет осмотическую регуляцию, осаждаёт муть и выделяет специфический видовой запах [6]. Так, например, с бактерицидными свойствами слизи линия связывают повышенную устойчивость его к заражению паразитами, в отличие от других представителей рыб этого семейства. Показана антимикробная активность компонентов слизи по отношению к золотистому стафилококку (*st. aureus*) кишечной палочке (*e. coli*), а также фунгицидная активность по отношению к *Candida albicans*. Имеются сведения о проявлении противораковой активности компонентов слизи [7, 8].

По некоторым данным регулярная секреция и отторжение слизи защищают рыб от паразитов и патогенных бактерий. Индуцируемые в кожном секрете вещества, такие как иммуноглобулины, комплементы, лизоцимы, С-

реактивный белок, антибактериальные пептиды, протеазы, лектин, гемолизин и мукополисахариды определяют защитные свойства слизи [9, 10].

Рыбы, лишенные чешуи или чешуя которых редуцирована (к числу которых относится также и клариевый сом), отличаются повышенным выделением секреторной жидкости поверхностью кожи. А это значит, что слизь, являясь побочным и нежелательным продуктом на рыбоперерабатывающих предприятиях, может стать источником получения новых фармакологически-активных веществ.

Данная работа посвящена изучению возможности выделения и анализа пептидов секрета (слизи) клария угревидного. В связи с тем, что данный вид рыбы выращивается в установках замкнутого цикла рядом рыбных хозяйств России, процесс получения слизи не представляет никаких технических трудностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Белково-пептидная фракция была выделена осаждением из водно-солевых растворов слизи. Данный процесс включал следующие этапы: растворение слизи в водном растворе соли, удаление механических примесей фильтрованием или центрифугированием, высаливание высокомолекулярной белковой фракции, очистка на сорбенте (при необходимости) и осаждение пептидов неводным растворителем. После достижения полноты осаждения пептиды отделяли фильтрованием или центрифугированием, промывали на фильтре неводным растворителем и высушивали под вакуумом. Полученный продукт представлял собой порошок серо-голубого цвета без запаха, легко растворимый в воде.

Пептидно-белковая природа выделенного продукта подтверждалась методом ИК-спектроскопии с помощью ИК-фурье спектрометра Perkin Elmer Frontier в диапазоне волновых чисел $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$, с разрешением 1 см^{-1} , (сканов-20). ИК-спектры снимали в таблетке с KBr.

Масс-спектрометрический анализ выделенной фракции осуществляли высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с использованием системы Ultimate 3000 RS («Thermo Scientific», США) в сочетании с масс-спектрометром Q-exactive («Thermo Scientific», США) с орбитальной ловушкой и квадрупольным масс-анализатором. Элюирование проводили на колонке Acquity UPLC Peptide BEH C18 $50\times 2.1\text{ мм}$ с размером частиц 1.7 мкм в градиентном режиме (скорость потока – 0.3 мл/мин ; А – 0.1% муравьиная кислота; Б – 90% ацетонитрил, 0.1% водный раствор муравьиной кислоты; от 5 до 50% Б за 30 мин, далее до 100% Б за 5 мин, после 5 мин промывки возвращались к начальным условиям и уравнивали колонку). МС-анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive в режиме положительной ионизации с использованием источника HESI («Thermo Scientific», США) со следующими параметрами настроек: напряжение на эмиттере 3.5 кВ , температура капилляра $320\text{ }^{\circ}\text{C}$. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 до 1500 m/z при разрешении 70 000.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объект исследования – кожный секрет клария угревидного был предоставлен компанией ООО «Панинское Плюс» (Курская область) на котором данный вид рыбы выращивается с использованием установок замкнутого цикла при соблюдении всех санитарных норм и правил.

Выделение пептидной фракции осуществлялось по методике описанной выше и выгодно отличается от стандартных методик применяемых для получения пептидных препаратов благодаря особенностям

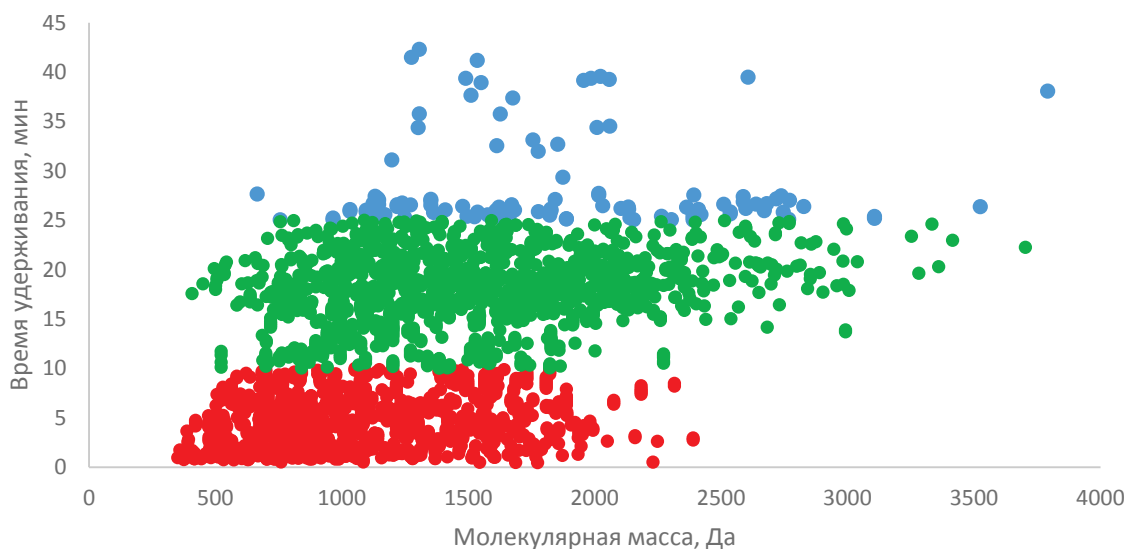


Рисунок 1. 2D- масс-спектрограмма пептидной фракции экстракта секреторной жидкости *Clarias gariepinus*

используемого сырья. Одним из основных условий полного выделения пептидов кожного секрета является эффективное диспергирование вязко-текучей массы слизи в водно-солевом растворе.

Белково-пептидная природа выделенного экстракта была подтверждена методом ИК-спектроскопии. Были найдены следующие характеристические полосы поглощения: амид А – ок. 3300, амид В – ок. 3100, амид I – 1654; амид II – 1504 см^{-1} . Приведенные полосы однозначно указывают на белковую природу полученного продукта, что дополнительно подтверждалось сравнением полученного спектра с библиотечными аналогами.

Полученные серии многозарядных ионов для анализируемых пиков также подтверждают пептидную природу анализируемых веществ. В частности, в исследованных экстрактах обнаруживается «пептидный шум» с диапазоном масс порядка 500-3500 Да, в котором наблюдаются особенно интенсивные молекулярные ионы, соответствующие молекулярным массам: 665,72, 681,698, 876,65, 892,62, 2637,43, 2661,27, 2844,35. Из пептидов более высокого массового диапазона (до 10000 Да) наибольшей интенсивностью отличаются ионы, соответствующие M_w – 8930,5 Да.

Результаты МС-экспериментов представлены в виде двумерной (2D) масс-спектрограммы. Каждая точка 2D-спектрограммы соответствует пептиду: по оси «X» отложено значение молекулярной массы этого пептида, а по оси «Y» – значение хроматографического времени удерживания пептида, характеризующее скорость прохождения пептида через хроматографическую колонку.

Анализ расположения точек на объединенной 2D-масс-спектрограмме пептидной фракции экстракта секреторной жидкости показывает, что в составе преобладают хорошо удерживаемые пептиды с молекулярной массой 2000-3000 Да, а также более короткие гидрофильные пептиды.

Полученные в результате высокоэнергетической фрагментации, индуцированной столкновением (HCD), масс-спектры были проанализированы посредством тандемной МС.

Последовательности пептидов определяли с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer 1.4. (Thermo Scientific) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей UniProt (uniprot-catfish+AND+organism__Clarias+gariepinus+[13013]). Программно было найдено 14547 пептидных последовательностей, относящихся к 131 группе белков. Пептиды с максимальной достоверностью секвенирования приведены в таблице 1.

Показано, что экстракт секреторной жидкости содержит большое количество пептидов, относящихся к различным классам белков протеома *Clarias gariepinus* (бета-актины, семейство цитохрома, белки теплового шока, миостатин, НАДН-дегидрогеназный комплекс и др.), которые определяют широкий набор описанных ранее биологических свойств, характерных для кожного секрета рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была предпринята попытка выделения и анализа пептидной фракции довольно перспективного объекта – секреторной жидкости (слизи) клария угревидного. В результате – подтверждена пептидно-белковая природа полученного экстракта и осуществлен масс-спектрометрический анализ выделенной фракции.

Таблица 1. Примеры пептидов, выделенных из экстракта секреторной жидкости *Clarias gariepinus*

Пептид	UNIPROT	MH ⁺ , Да	t _R , мин
LTEAPLNPKANREKM	G9J5Z5;A0A075F7H2	1711,91775	17,58
MGQKDSYVGDEAQSQRGILT	A0A075F7H2	2183,07998	18,85
WISKQEYDESGPSIVHRK	A0A075F913	2159,09194	18,71
LTEAPLNPKANREKMTQ	G9J5Z5;A0A075F7H2	1941,02236	17,46
LRVAPEEHPVL	G9J5Z5;A0A075F7H2	1259,70938	20,52
DDAPRAVFPSIVGRPRHQQ	A0A075F7H2	2075,09047	20,77
SGGTTMYPGIADRMQKE	A0A075F913	1841,85294	20,23
KAGFAGDDAPR	A0A075F7H2	1104,54435	2,57
RVAPEEHPVL	G9J5Z5;A0A075F7H2	1146,62885	17,84
LSIEKASSHLQGGAKRVVVS	Q98TW5	2066,17959	19,38
TLIAYKNGKLGVNAEHSWADAPIVgh	A0A2K9YCM2	2760,45693	19,84
YALPHAILR	G9J5Z5	1053,62180	21,48
LTEAPLNPKANREK	G9J5Z5;A0A075F7H2	1580,87490	8,28
RDVVKQLLPK	A0A023NM74	1195,74131	20,84
RLPPISYTGRFTLE	Q8JIX2	1649,88462	21,73
AMNPNTNIFDAKRLIGRR	A1YAQ6	2074,13222	18,28
VVDNGSGMCK	A0A075F7H2	1009,44481	1,99
ISNLANLALP	A0A342KC26	1025,60063	19,84

Пептид	UNIPROT	MH ⁺ , Да	t _R , мин
SLAPSTMKIKIIPPERK	A0A075F913	1980,16860	21,54
FPETWGGGSVKVYVLV _y	A0A0K0TNJ2	1899,98391	16,64
KTKRRREIESLVISD _p	A0A2K9YCK5	1926,11831	18,46
WDDMEKIWHHTF	A0A075F7H2	1644,72818	24,45
GHLSVFKNSTWDHIMHKFVIGHLKG	A0A142I5D6	2888,51674	19,70
SYVGDEAQSKRGILT	A0A075F7H2	1623,83255	18,88
DEELLDGSLDSVDLKKDLQIP	A0A482G8P2	2342,17641	20,97
FAGDDAPR	A0A075F7H2	848,39012	2,39
MAGGVDTTAVPLQFAL	G3EBT3	1590,82560	3,93
GERQLVKVVKWAKGLP _g	A3QQ63	1864,12758	19,40
ETPTFTTAARFRVAATLVLFVFAA _a	O42329	2670,46230	25,96
DVLCEFTDSSGHVDALDFLRVVDV	D7PC79	2853,35390	19,52
KNDPPMEAGTFTAQVII	A0A2K9YCN9	1831,93203	16,65
AVFPSIVGRPRHQG	A0A075F7H2	1520,84534	19,92
LMACAQTGSGKTA AFLPI	D9Z8J0	1892,98537	16,60
LAGPDGTAEIEIKDNI	A0A3R5SGA5	1654,85525	16,24
LLKDTRSIEn	E7BTQ2	1187,66343	19,90
KSSAVYHVLKSSNYVARF	D7PC79	2056,08022	17,68
NKFPRYVGAGGGFGPVAd	A0A2K9YCM2	1807,92251	17,09
VIILNHPGQIS	A0A2K9YCN9	1190,68804	21,06
NNAVIRVQHLHLQAAKMM	A3FMP7	2074,13222	18,28
VRVELLLGSPL	A0A0D3QG04	1195,74131	20,84
MLWAPMPIPNPVADMNLGm	A0A0K0TNI8	2097,00112	16,97
VSGECPLTLDEVLN	G8I0Y9	1488,73798	19,65
LTALGLASVFIGGWAGLNQTQL	A0A342KC34	2230,24502	22,42
ATPLSQGQVALR _r	C5HYK6	1395,81223	24,87
FFINLIPLIIF	A0A0K0TNJ6	1349,82813	19,74
RTNANEATRKASVGLE	A0A2P1IUK5	1716,90395	16,05
LPGPYWLLGLGP	D7PC79	1282,72931	22,72
YMKPLLVGELASSE _p	A0A142I5D6	1632,86094	24,16
SVVSNIYNSPVTTPPL	Q8JIX2	1590,82505	4,49
LRERSGFTVRP	E7BTQ2	1317,73862	2,73
TGATILLCLVLEIGQ	P53542	1656,95461	19,15
SRAAPHVRKLCEKYGVVYQ	A0A142I5D6	2204,16469	19,71
YLMIVWMGPKYMRNRQ	Q68YU2	2086,04349	17,75
YVGDEAQSKRGILT	A0A075F7H2	1536,80344	17,93
YALPHAIL	G9J5Z5	897,52056	23,97
QLNIDFRDVDLSELSSDVISH	E2FHQ1	2372,17690	17,61
AVYSILGSGWASNSKYALIGALRAVAQTISYE	A0A0K0TNI8;A0A342KC35	3359,78579	20,30
ADAAQKPPYSYVAL _i	G3EBS8	1605,85910	21,42
FAGDDAPRA	A0A075F7H2	919,42717	4,96
FTLLQVDITQP _q	F4Y9J7	1401,76865	18,99
LKYPIE	A0A075F7H2	762,43926	19,00
TPTLILHNFSNMLGFF	A0A0K0TNJ6	1851,94741	16,12
KLTGRVLSLSFDAPGRILWAGDDRGSI _{FSF}	F4ZZV6	3281,75454	19,64
QIPINEKELL _v	D7PC79	1294,76355	24,94
LRLTKNGITEVERNAFNG	Q9PW16	2032,09037	26,46
KKSQSDVVGGALAPLALPTK	A0A2P1IUL2	1980,16860	21,54
VAFQFTVSPDGIDLQLSHE _a	A0A2K9YCK4	2173,07729	17,66
GLMMVTIGLNQPPQLAFLH	A0A0K0TNJ6	1983,03879	18,10
KEITSLAPSTMKIK	A0A075F913	1546,88198	6,74
LEVKISEVPKRTRRe	A0A023NM74	1839,08364	18,54
DEELLDGSLDSVDLKKDLQIPE	A0A482G8P2	2471,22304	21,21

Нами выделены пептиды, относящиеся к семействам белков обладающих совершенно различным функционалом свойств. Поэтому перспективным представляется сужение рамок поиска пептидных фракций, относящихся к белково-пептидному пулу, проявляющему определенный вид биологической активности. С этой точки зрения, актуальной задачей является не идентифицировать все программно найденные пептидные последовательности (14547), а попытаться сузить границы поиска путем выделения более узких массивов пептидных фракций, с последующим определением возможной биологической активности каждой из них. Для этого планируется методом препаративной хроматографии выделить узкие фракции пептидного пула и, в случае выявления у данной фракции биологически-активных свойств, последующего определения ее точного пептидного состава.

Список литературы / References:

1. Артеменко К.А., Самгина Т.Ю., Дойл Дж Р., Льюеллин Л.Е., Билусич Д., Бови Дж Х., Лебедев А.Т. Защитные пептиды, выделенные из кожного секрета европейской озерной лягушки *Rana ridibunda*. *Масс-спектрометрия*, 2007, т. 4 (2), с. 79-88. [Artemenko K.A., Samgina T.Yu., Dojl Dzh R., L'yuellin L.E., Bilusich D., Bovi Dzh H., Lebedev A.T. Zashchitnye peptidy, vydelennye iz kozhnogo sekreta evropejskoj ozernoj lyagushki *Rana ridibunda*. *Mass-spektrometriya*. 2007, vol. 4 (2), pp. 79-88. (In Russ.)]
2. Xiao Mei Wang, Wei Dai, Ke Zhing Xing, Tian Jun Li, Xin Wang Antibacterial activities of antibacterial proteins/peptides isolated from organs and mucus of *Clarias gariepinus* reared at high stocking density. *Advanced Materials Research*, 2012, pp. 455-460.
3. Chen Cheng-xun Research on the isolation and purification of antimicrobial peptide in the surface mucus of catfish body and its antimicrobial activity. *J. of Anhui Agricultural Sciences*, vol. 26, 2010.
4. Tingting Li, Quanwei Liu, Dangfeng Wang, Jianrong Li Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. *Fish and shellfish immunology*, vol. 92, 2019, pp. 881-888.
5. Фомина Л.Л., Кулакова Т.С., Жунина О.А., Ошуркова Ю.Л., Вайцель А.Э. Оценка гемостатической активности слизи кожи рыб in vitro. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*, 2018, № 4 (40), с. 7-11. [Fomina L.L., Kulakova T.S., Zhunina O.A., Oshurkova YU.L., Vajcel' A.E. Ocenka gemostaticheskoy aktivnosti slizi kozhi ryb in vitro. *Aktual'nye voprosy veterinarnoy biologii*, 2018, no. 4 (40), pp. 7-11. (In Russ.)]
6. Козыренко Е.А., Оттесен О., Амин А. Особенности распределения и химического состава слизистых клеток в эпидермисе атлантической трески *Gadus morhua* L. *Вестник МГТУ*, 2010, т. 13, № 4/1, с. 655-660. [Kozyrenko E.A., Ottesen O., Amin A. Osobennosti raspredeleniya i himicheskogo sostava slizistyh kletok v epidermise atlanticheskoy treski *Gadus morhua* L. *Vestnik MGTU*, 2010, vol. 13, no. 4/1, pp. 655-660. (In Russ.)]
7. Лебедева Н.Е., Головкина Т.В. Состав и некоторые свойства слизи растительноядных рыб как критерий стрессового состояния. *Вестник Моск. Ун-та*, 1987, сер. 16, № 4, с. 28-33. [Lebedeva N.E., Golovkina T.V. Sostav i nekotorye svojstva slizi rastitel'noyadnyh ryb kak kriterij stressovogo sostoyaniya. *Vestnik Mosk. Un-ta*, 1987, iss. 16, no. 4, pp. 28-33. (In Russ.)]
8. Sangeetha Subramanian, Neil W Ross, Shawna L MacKinnon Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, vol. 150(1), pp. 85-92.
9. Ellis A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, no. 25, pp. 839.
10. Ingram G.A. Substances involved in the natural-resistance of fish to infection - a review. *J. Fish Biol.*, 1980, no. 16, pp. 23-60.

CHROMATO-MASS-SPECTROMETRIC STUDY OF SKIN SLIME PEPTIDES OF FISH WITHOUT SCALES

Merkulova N.L.¹, Grekhnyova E.V.¹, Chuikova S.V.², Malyshev V.N.²¹ Kursk State University*Radishcheva st. 33, Kursk, 305000, Russia; e-mail: grekhnyovaev@yandex.ru*² Limited Liability Company «Aquatetechnologies»,*Malinovaya st. 66, Kursk, 305023, Russia*

Abstract. In this work, the isolation and analysis of the peptide fraction of the secretory fluid of *Clarias gariepinus* was carried out. Isolation was carried out by reprecipitation methods and was accompanied by intermediate purifications on sorbents. The peptide nature of the isolated fraction was confirmed by IR spectroscopy. Mass spectrometric analysis of the peptide fraction of the secretory fluid extract showed that well-retained peptides with a molecular weight of 2000-3000 Da, as well as shorter hydrophilic peptides predominate in the composition. Peptide sequences were determined using Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Scientific) using the UniProt amino acid sequence database (uniprot-catfish + AND + organism__Clarias + gariepinus + [13013]). 14547 peptide sequences belonging to 131 protein groups were found programmatically. It was shown that secretory fluid extract contains a large number of peptides belonging to various classes of *Clarias gariepinus* proteome proteins (beta-actins, cytochrome family, heat shock proteins, myostatin, NADH-dehydrogenase complex, etc.), which determine a wide range of biological properties characteristic for skin secretion of fish. Further study of the skin secretion of *clarius* seems promising in terms of fractionation of the peptide pool and determination of the pharmacological activity of a narrower fraction.

Key words: *Clarias gariepinus*, skin secretion, peptide fractions, mass spectrometry, sequencing.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛАГЕЛЛИНА И СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ В ХОДЕ ОБРАЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА СЕРЕБРА МЕТОДОМ БАКТЕРИАЛЬНОГО СИНТЕЗА

Пластун И.Л., Захаров А.А., Наумов А.А.

Саратовский государственный технический университет им. Ю.А. Гагарина
ул. Политехническая, 77, г. Саратов, 410054, РФ; e-mail: inna_pls@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.07.20

Аннотация. Методами квантовохимического молекулярного моделирования исследуется межмолекулярное взаимодействие белковых структур с солями рабочего раствора, используемого для получения наночастиц сульфида серебра методом биосинтеза с помощью грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* 168. Одной из определяющих компонент бактериального синтеза является белок флагеллин, способный самоорганизовываться в полые цилиндрические структуры и, как показывают экспериментальные исследования, являющийся единственным белком, адсорбируемым на поверхности образующихся наночастиц при синтезе на основе *Bacillus subtilis* 168. В качестве исследуемых объектов рассматривались соли AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, участвующие в процессе синтеза, и нестандартная аминокислота метиллизин, входящая в состав флагеллина. Исследование комплексообразования проводилось на основе расчёта молекулярных структур и ИК-спектров методами теории функционала плотности с функционалом B3LYP и базисным набором 6-31G (d) при помощи программного комплекса Gaussian 09 и анализа параметров образующихся водородных связей. В ходе моделирования было обнаружено, что метиллизин образует достаточно устойчивые молекулярные комплексы с нитратом серебра AgNO_3 и тиосульфатом натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Это даёт возможность говорить о существенной роли метиллизина в образовании наночастиц сульфида серебра и проясняет механизм его функционирования в составе флагеллина.

Ключевые слова: флагеллин, метиллизин, наночастицы сульфида серебра, молекулярное моделирование, комплексообразование, водородные связи, теория функционала плотности.

Интерес к получению и использованию углеродных и металлических наночастиц для самых разнообразных применений в биофизике, биотехнологии и медицине постоянно возрастает. Широко известно использование алмазоподобных и металлических наночастиц, а также углеродных наноструктур для адресной доставки и удержания лекарственных препаратов в клетках. Исследуются возможности применения коллоидных квантовых точек для улучшения качества изображения в компьютерной и магнитной резонансной томографии. В частности, большие перспективы в сфере биофизики могут иметь наночастицы сульфида серебра, получаемые с помощью биосинтеза на основе грамположительных и грамотрицательных бактерий [1]. Получаемые частицы обладают высокой степенью биосовместимости за счёт белковой оболочки, а их малый размер позволяет их использовать в полупроводниковых технологиях в качестве квантовых точек, а также в биомедицине как флуоресцентные метки для прижизненной визуализации различных биопроцессов и как средство удержания лекарственных препаратов в клетках.

В работе исследуются механизмы межмолекулярного взаимодействия белковых структур с солями рабочего раствора, используемого для получения наночастиц сульфида серебра, а именно – с водными растворами солей нитрата серебра AgNO_3 и тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. В качестве исследуемого белка рассматривается бактериальный белок флагеллин, поскольку, как показано в экспериментальном исследовании [2], при биосинтезе с помощью грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* 168 только этот белок сорбируется на поверхности наночастиц сульфида серебра NpAg_2S и, таким образом, является одной из важнейших составляющих процесса бактериального синтеза на основе *Bacillus subtilis* 168. Необходимо отметить, что в экспериментах по сравнительному анализу состава белковых оболочек наночастиц, полученных методами биосинтеза на основе грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* 168 и грамотрицательных бактерий *Shewanella oneidensis* MR-1 и *Escherichia coli* K12 [2], наблюдалось сильное различие состава белковых оболочек наночастиц. Как отмечается в [2], у наночастиц, синтезированных на основе *E. coli* K12 в составе флагеллина не было, а размер оболочки наночастиц был наименьшим (общий диаметр 43 нм при диаметре самой наночастицы NpAg_2S 8 нм). У наночастиц, синтезированных на основе *Shewanella oneidensis* MR-1 флагеллин присутствует в составе 11 белков оболочки, при этом размер оболочки был несколько больше, чем в случае синтеза на основе *E. coli* K12 (106,8 нм при размере наночастицы NpAg_2S 8 нм), а при биосинтезе с помощью бактерий *Bacillus subtilis* 168 оболочку составляет исключительно флагеллин, причём размер этой оболочки существенно больше, чем при синтезе на основе грамотрицательных бактерий (163,6 нм при размере наночастицы NpAg_2S 10 нм). Таким образом, можно сделать вывод о существенной роли флагеллина в образовании белковой оболочки.

Флагеллин представляет собой белок, образующий нить жгутика бактерии [3], способный самоорганизовываться в полые цилиндрические структуры и являющийся лигандом для рецептора врождённой иммунной системы TLR5. Полный состав аминокислот флагеллина из состава *Bacillus subtilis* 168 приведён в [4]. Необходимо отметить, что в состав флагеллина у многих бактерий входит нестандартная аминокислота метиллизин $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$ [3,5,6]. Нестандартные, или необычные, аминокислоты не входят в

во всех живых организмах 20 аминокислот, однако могут обнаруживаться в составе некоторых типов белков [5], являясь производными обычных аминокислот и могут включаться в состав белков как во время их синтеза, так и в результате дополнительных ферментативных реакций.

Как отмечается в [6], синтез метиллизина происходит уже в составе молекулы флагеллина путем метилирования лизина $C_6H_{14}N_2O_2$, то есть замещения водорода метильной группой $-CH_3$ с помощью S-аденозил- метионина, при этом метилированные остатки лизина находятся на поверхности молекулы флагеллина. Биологический смысл образования лизиновых производных может заключаться в том, что молекула после метилирования становится более устойчивой к воздействию внешних факторов [6]. Кроме того, метиллизин присутствует в мышечном белке миозине, участвующем в работе сократительной системы [5]. Таким образом, можно сделать предположение, что метиллизин играет важную роль в образовании наночастиц, способствуя «скручивающему» и «обволакивающему» эффекту, чем обеспечивает более прочную и объёмную белковую оболочку образующихся наночастиц, что наблюдалось экспериментально [2]. Однако, данное предположение необходимо подтвердить на основе исследования межмолекулярного взаимодействия метиллизина с компонентами рабочего раствора.

Одним из методов оценки степени межмолекулярного взаимодействия, определяющего механизмы образования наночастиц, является исследование возможности комплексообразования метиллизина с солями тиосульфата натрия $Na_2S_2O_3$ и нитрата серебра $AgNO_3$ на основе расчётов молекулярных структур и ИК спектров и анализа параметров образующихся в смеси водородных связей.

Ранее нами проводились подобные численные оценки для анализа степени межмолекулярного взаимодействия модифицированных наноалмазов с биомолекулами и лекарственными препаратами [7], где на основе рассмотрения фрагментов крупных молекулярных структур можно сделать вывод о степени комплексообразования. Хорошее совпадение с экспериментальными результатами дает возможность распространить данную методику и на другие задачи.

Моделирование структуры и расчёт спектров молекул и их комплексов осуществлялись на основе метода теории функционала плотности (ТФП) [8] с использованием функционала B3LYP [9], в котором применяется представление молекулярных орбиталей в виде линейной комбинации линейно-независимых функций, называемых базисными. В качестве базисных функций в данной работе использовался гауссовский тип функций в валентно-расщеплённом базисном наборе. Такие базисы отличаются повышенной точностью, что достигается представлением валентных орбиталей двумя наборами функций. Валентно-расщеплённые базисы обозначаются M-NPG, где M обозначает количество простых гауссовых функций, входящих в состав базисной функции атомной орбитали, N и P показывают, что каждая валентная орбиталь состоит из двух базисных функций, первая из которых представляет собой линейную комбинацию N простых гауссовых функций, а вторая P простых гауссовых функций [9]. В данной работе процедуры оптимизации геометрии молекулярных структур и расчёт ИК-спектров производились с использованием базисного набора 6-31G(d), в котором атомные орбитали электронов внутренней оболочки аппроксимируются шестью гауссовыми функциями, $M = 6$, а орбитали валентной оболочки описываются соответственно тремя ($N = 3$) и одной ($P = 1$) гауссовой функцией с добавлением поляризационных компонент.

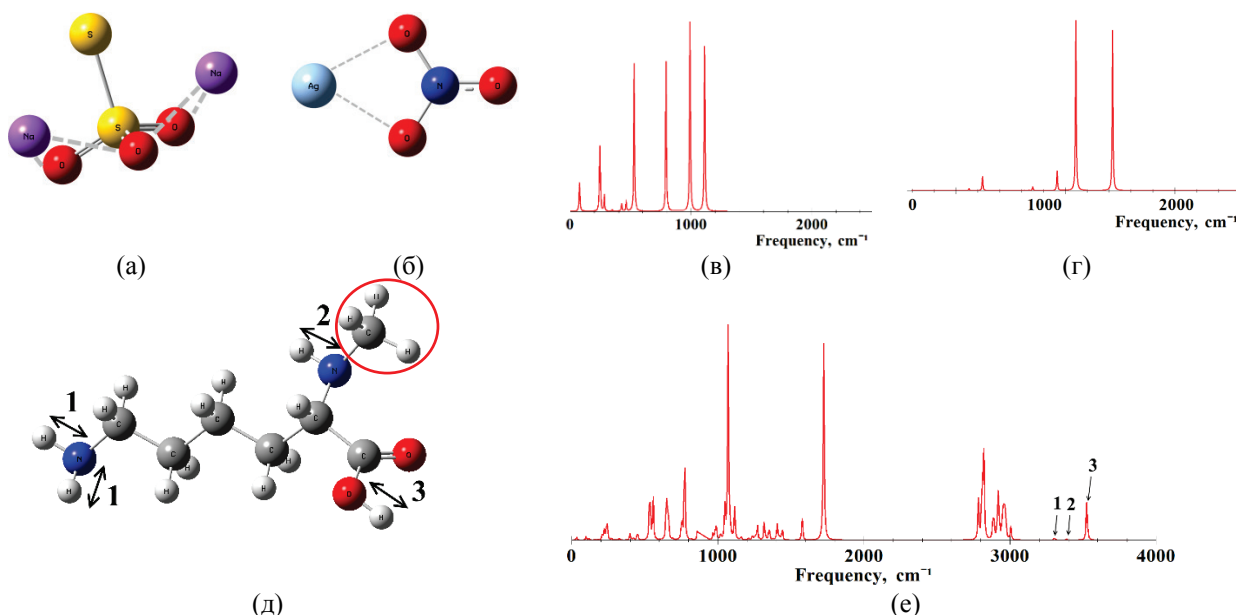


Рисунок 1. Рассчитанные структуры (а,б,д) и ИК спектры (в,г,е) молекул тиосульфата натрия $Na_2S_2O_3$ (а,в), нитрата серебра $AgNO_3$ (б,г) и метиллизина (д,е)

Все процедуры молекулярного моделирования были проведены с использованием программного комплекса Gaussian 09 [10], который широко применяется для решения задач молекулярного моделирования в различных сферах вычислительной физики и химии.

В ходе вычислений были рассчитаны структура и ИК спектры молекул метиллизина, тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и нитрата серебра AgNO_3 , а также молекулярных комплексов метиллизина с каждой солью и с обеими солями одновременно. На рисунке 1 представлены рассчитанные структуры и ИК спектры отдельных составляющих исследуемой молекулярной системы.

Поскольку целью исследования является анализ параметров водородных связей как одной из основных характеристик степени межмолекулярного взаимодействия и комплексообразования в многокомпонентных смесях [11,12], то основное внимание будем обращать на высокочастотную область ИК спектра (от 2000см^{-1} и выше), где проявляются частотные резонансы, соответствующие колебаниям образующихся водородных связей.

В высокочастотной области рассчитанного ИК спектра метиллизина заметны пики (1-3 на рис. 1е), соответствующие валентным колебаниям связей N-H (1-2) и O-H (3) (рис. 1д). Частоты валентных колебаний связей составляют: 1 – 3380см^{-1} , 2 – 3388см^{-1} , 3 – 3526см^{-1} , длины связей – $0,98\text{Å}$. Также в области 3000см^{-1} заметны пики, соответствующие колебаниям связи C-H метильной группы $-\text{CH}_3$ (рис. 1е), появляющейся у лизина $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ в результате метилирования (на рисунке 1д эта группа выделена).

Структуры и спектры образующихся молекулярных комплексов показаны на рисунках 2-4.

Сила образовавшихся водородных связей оценивалась по длине водородного мостика, сдвигу частоты валентных колебаний O-H связей в ИК-спектрах молекулярного комплекса относительно ИК-спектра отдельных молекул, а также по энергии связи, которая рассчитывалась по эмпирической формуле Иогансена [11].

$$-\Delta H = 0,3 \cdot \sqrt{\Delta\nu - 40}, \quad (1)$$

где $\Delta\nu$ – величина частотного сдвига для валентных колебаний O-H связей (ΔH в ккал/моль, $\Delta\nu$ в см^{-1}).

Были рассчитаны различные возможности комплексообразования солей с метиллизином. Как показали расчёты, как для тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, так и для нитрата серебра AgNO_3 существует несколько различных вариантов присоединения к метиллизиону (рис. 2 и 3), однако не все они являются равноценными.

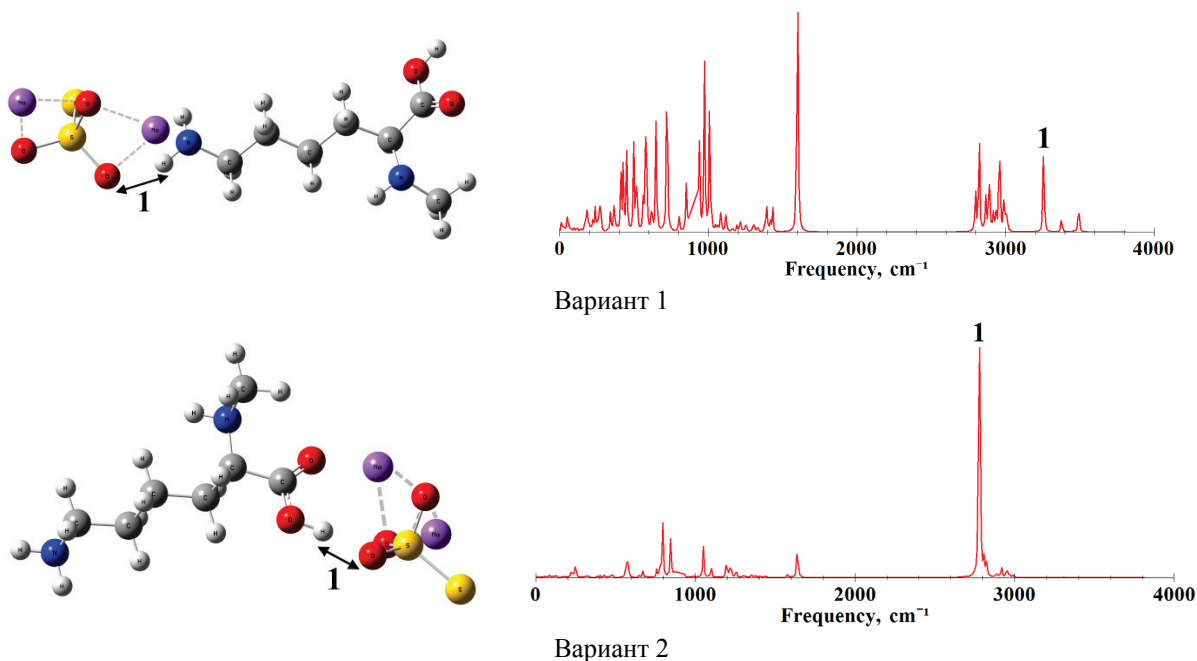


Рисунок 2. Структуры (слева) и рассчитанные ИК-спектры (справа) для двух различных вариантов образования молекулярного комплекса тиосульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ - метиллизин

Таблица 1. Рассчитанные параметры водородных связей для трёх вариантов молекулярного комплекса тиосульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ - метиллизин

Номер варианта/ номер связи	Длина O-H связи $R_{\text{O-H}}$, Å	Длина водородного мостика $R_{\text{O-H} \cdots \text{O}}$, Å	Частота ν , см^{-1}	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, см^{-1}	Энергия связи $-\Delta H$, ккал/моль	Интенсивность I_{IR} , км/моль
1/1	1,01	2,83	3256	132	2,87	228
2/1	0,99	2,63	2782	743	8,01	3956
3/1	1,02	3,01	3316	64	1,46	118

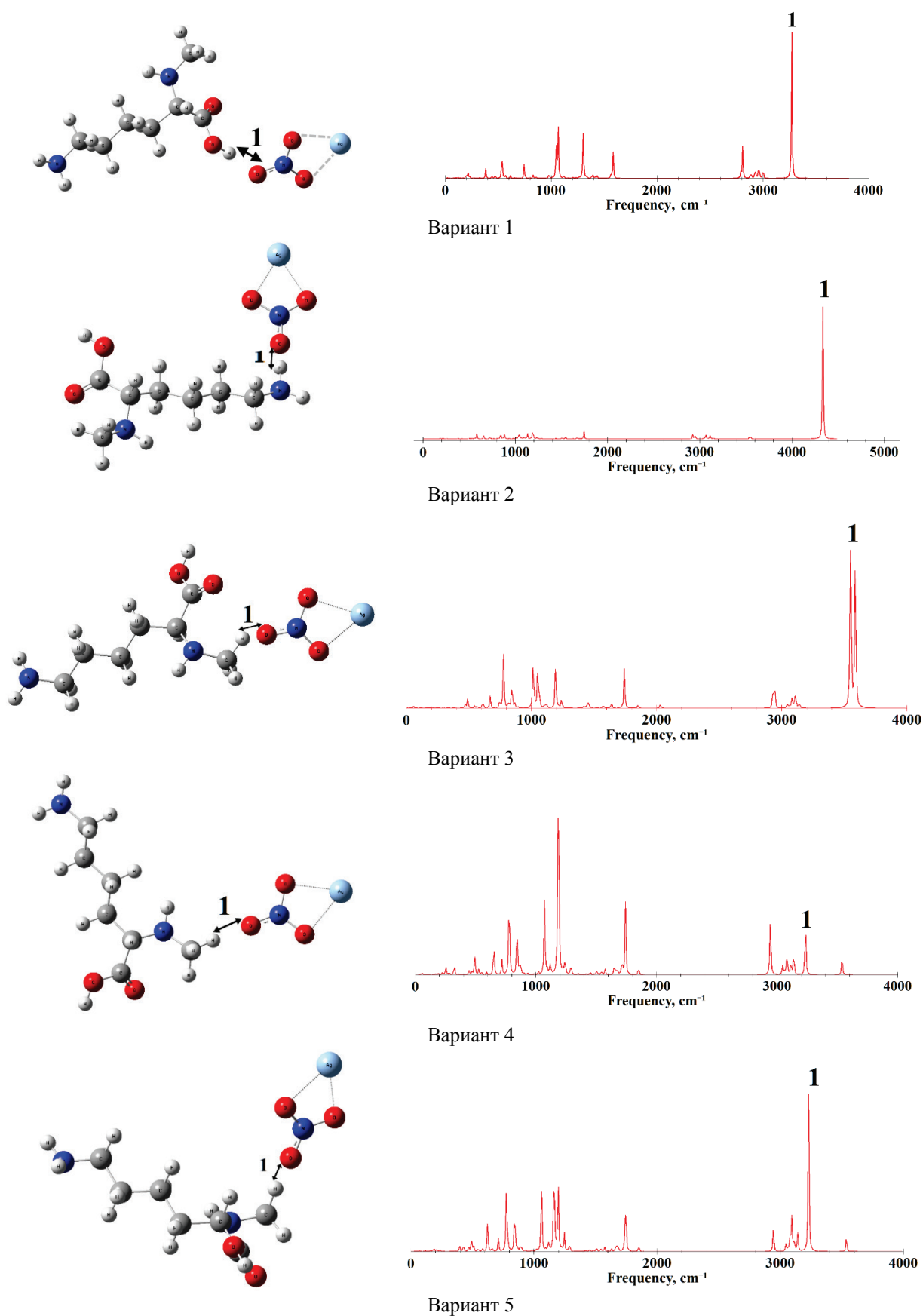


Рисунок 3. Структуры (слева) и рассчитанные ИК-спектры (справа) для 5 различных вариантов образования молекулярного комплекса нитрат серебра AgNO_3 - метилизин

Таблица 2. Рассчитанные параметры водородных связей для трёх вариантов молекулярного комплекса нитрат серебра AgNO_3 - метиллизин

Номер варианта/ номер связи	Длина О—Н связи $R_{\text{O} \cdots \text{H}}$, Å	Длина водородного мостика $R_{\text{OH} \cdots \text{O}}$, Å	Частота ν , cm^{-1}	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, cm^{-1}	Энергия связи - ΔH , ккал/моль	Интенсивность I_{IR} , км/моль
1/1	1,18	2,79	3273	252	4,37	1312
2/1	0,99	2,1	4335	713	7,78	4635
3/1	1,01	2,2	3552	440	6,01	1375
4/1	1,19	2,8	3236	124	2,75	240
5/1	1,11	2,59	3231	282	4,67	725

Для тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ были рассмотрены три варианта комплексообразования, в двух из которых образуются водородные связи средней силы (варианты 1 и 2). Структура и ИК спектры для этих вариантов показаны на рисунке 2, а параметры водородных связей указаны в таблице 1. В третьем варианте образуется слабая водородная связь (параметры связи этого варианта также указаны в таблице 1). Наиболее сильной является водородная связь $\text{O} \cdots \text{H} \cdots \text{O}$ (вариант 2). Частота валентных колебаний связи $\text{O} \cdots \text{H}$ составляет 2782 cm^{-1} (рис. 2, вариант 2). При образовании этой водородной связи наблюдается частотный сдвиг в длинноволновую область $\Delta\nu = 743 \text{ cm}^{-1}$, при этом длина образовавшегося водородного мостика составляет $2,63 \text{ Å}$, а энергия данной водородной связи составляет $8,01 \text{ ккал/моль}$, что соответствует средней водородной связи, приближающейся к сильной.

При анализе водородных связей в комплексообразовании молекул метиллизина с нитратом серебра AgNO_3 были рассмотрены пять вариантов присоединения (рис. 3, табл. 2). Необходимо отметить, что в трёх из пяти рассмотренных вариантов комплексообразования присоединение происходит через метильную группу $-\text{CH}_3$ метиллизина (варианты 3,4,5), причём во всех трёх случаях водородные связи относятся к связям средней силы. Наиболее сильное взаимодействие наблюдается в случае присоединения через группу $\text{N} \cdots \text{H}$ (вариант 2). При образовании этой водородной связи наблюдается частотный сдвиг в длинноволновую область $\Delta\nu = 713 \text{ cm}^{-1}$, а интенсивность образовавшегося пика достаточно высока: $I_{\text{IR}} = 4635 \text{ км/моль}$. При этом энергия данной водородной связи составляет $7,78 \text{ ккал/моль}$, что соответствует средней водородной связи, приближающейся к сильной, и говорит о высокой степени стабильности образующейся молекулярной структуры.

В ходе исследования также была рассмотрена возможность образования молекулярного комплекса в трёхкомпонентной смеси метиллизина с обеими солями одновременно. На рисунке 4 показан один из примеров такого комплексообразования: структура и ИК спектр молекулярного комплекса нитрат серебра AgNO_3 - метиллизин - тиосульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Видно, что с каждой солью метиллизин образует водородную связь средней силы. Параметры связей указаны в таблице 3.

Видно, что и в том, и в другом случае возникают водородные связи средней силы: наблюдаются частотные сдвиги в длинноволновую область $\Delta\nu_1 = 304 \text{ cm}^{-1}$ и $\Delta\nu_2 = 227 \text{ cm}^{-1}$, энергия водородных связей составляет $4,88 \text{ ккал/моль}$ и $4,10 \text{ ккал/моль}$, соответственно. Данный пример является одним из нескольких возможных подобных трёхкомпонентных молекулярных комплексов, где сила образующихся водородных связей, как правило, является средней.

На основе результатов молекулярного моделирования различных вариантов комплексообразования метиллизина с солями нитрата серебра AgNO_3 и тиосульфата натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и последующего анализа параметров образующихся связей была установлена возможность образования нескольких водородных связей средней силы с энергиями от $2,75$ до $8,01 \text{ ккал/моль}$ как при двойном, так и при тройном комплексообразовании. Кроме того, необходимо отметить особое влияние процесса метилизации лизина, благодаря которой степень его взаимодействия в составе флагеллина существенно повышается. Таким образом, можно сделать вывод о том, что метиллизин образует достаточно устойчивые молекулярные комплексы с тиосульфатом натрия и нитратом

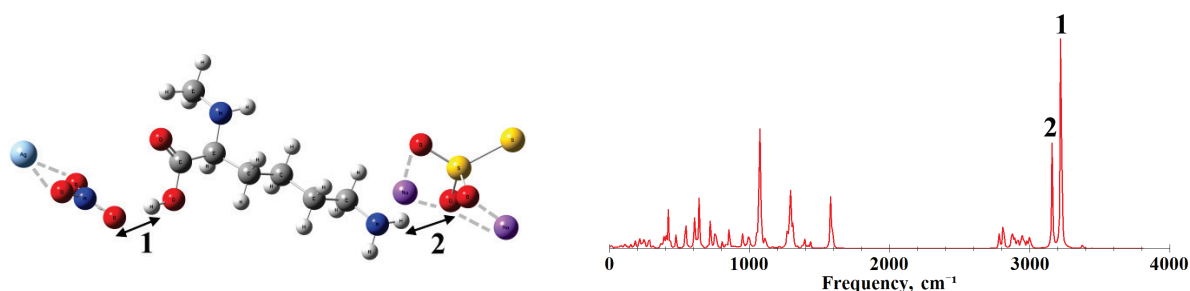
**Рисунок 4.** Структура (слева) и рассчитанный ИК-спектр (справа) молекулярного комплекса нитрат серебра AgNO_3 – метиллизин– тиосульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Таблица 3. Рассчитанные параметры водородных связей молекулярного комплекса нитрат серебра AgNO_3 - метиллизин - тиосульфат натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Номер связи	Длина О-Н связи $R_{\text{O-H}}$, Å	Длина водородного мостика $R_{\text{OH}\cdots\text{O}}$, Å	Частота ν , cm^{-1}	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, cm^{-1}	Энергия связи - ΔH , ккал/моль	Интенсивность I_{IR} , км/моль
1	0,99	2,77	3221	304	4,88	1265
2	1,01	3,03	3161	227	4,10	442

серебра, что даёт возможность говорить о его существенном вкладе в процесс образования наночастиц сульфида серебра методом биосинтеза с помощью грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* 168. Также необходимо отметить особую роль метиллизина при межмолекулярном взаимодействии в составе флагеллина, что данное исследование отчасти подтверждает.

Список литературы / References:

1. Воейкова Т.А., Шебанова А.С., Иванов Ю.Д., Кайшева А.Л., Новикова Л.М., Журавлёва О.А., Шумянцева В.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П., Дебабов В.Г. Роль белков внешней мембраны бактерий *Shewanella oneidensis* MR-1 в образовании и стабилизации наночастицы сульфида серебра. *Биотехнология*, 2015, № 5 с. 41-48. [Voeikova T.A., Shebanova A.S., Ivanov Yu.D., Kaysheva A.L., Novikova L.M., Zhuravliova O.A., Shumyantseva V.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Debabov V.G. A role of proteins of the outer membrane *Shewanella oneidensis* MR-1 Bacteria in the formation and stabilization of silver sulfide nanoparticles. *Biotechnology*, 2015, no. 5, pp. 41-48. (In Russ.)]
2. Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н.В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова Т.Н., Шайтан К.В., Дебабов В.Г. «Белковая корона» наночастиц сульфида серебра, полученных в присутствии грамотрицательных и грамположительных бактерий. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2017, т. 35 (4), с. 151-156. [Voeikova T.A., Zhuravliova O.A., Bulushova N.V., Veiko V.P., Ismagulova T.T., Lupanova T.N., Shaitan K.V., Debabov V.G. «Protein corona» of sulfide silver nanoparticles obtained in the presence of gram-negative and gram-positive bacteria. *Molecular genetics, microbiology and virology*, 2017, vol. 35 (4), pp. 151-156. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-4-151-156. (In Russ.)]
3. Громов Б.В. *Строение бактерий*. Л.: Издательство ЛГУ, 1985, 192 с. [Gromov B.V. *Structure of bacteria*. L.: Publishing of LSU, 1985, 192 p. (In Russ.)]
4. Delange R.J., Chang J.Y., Shaper J.H., Glaser A.N. Amino Acid Sequence of Flagellin of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological Chemistry*, 1976, vol. 251, no. 3, pp. 705-711.
5. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х т. Т.1. Пер. с англ. М.: Мир, 1985, 367 с. [Leninger A.L. *Principles of biochemistry*. Published by Worth Publishers, Inc. 1982. (In Russ.)]
6. Метлина А.Л. Жгутики прокариот как система биологической подвижности. *Успехи биологической химии*, 2001, т. 41, с. 229-282. [Metlina A.L. Prokaryotic flagella as a biological mobility system. *Advances in biological chemistry*, 2001, vol. 41, pp. 229-282. (In Russ.)]
7. Plastun I.L., Bokarev A.N., Zakharov A.A., Naumov A.A. Supramolecular interaction of modified nanodiamonds, biomolecules and drugs: molecular modeling. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 2020, vol. 28, iss. 3, pp. 183-190. DOI: 10.1080/1536383X.2019.1686618.
8. Кон В. Электронная структура вещества - волновые функции и функционалы плотности. *Успехи физических наук*, 2002, т. 172, № 3, с. 336-348. [Kohn W. Nobel Lecture: Electronic structure of matter - wave functions and density functionals. *Reviews of Modern Physics*, 1999, vol. 71, no. 5, pp. 1253-1266. (In Russ.)]
9. Попл Дж.А. Квантово-химические модели. *Успехи физических наук*, 2002, т. 172, № 3, с. 349-356. [Pople J. Nobel Lecture: Quantum chemical models. *Reviews of Modern Physics*, 1999, vol. 71, no. 5, pp. 1267-1274. (In Russ.)]
10. Frisch M.J., Trucks G.W., Cheeseman J.R., Scalmani G., Caricato M., Hratchian H.P., Li X., Barone V., Bloino J., Zheng G. et al. *Gaussian 09, Revision A.02*. Wallingford CT: Gaussian Inc., 2009.
11. Бабков Л.М., Пучковская Г.А., Макаренко С.П., Гаврилко Т.А. *ИК спектроскопия молекулярных кристаллов с водородными связями*. Киев: Наукова думка, 1989, 160 с. [Babkov L.M., Puchkovskaya G.A., Makarenko S.P., Gavrilko T.A. *IR Spectroscopy of Molecular Crystals with Hydrogen Bonds*. Kiev: Naukova Dumka, 1989, 160 p. (In Russ.)]
12. *Водородная связь*, под ред. Соколова Н.Д. М.: Наука, 1981, 196 с. [The Hydrogen bond, Edited by Sokolov N.D. M.: Nauka, 1981, 196 p. (In Russ.)]

MODELING OF FLAGELLIN AND METAL SALTS INTERMOLECULAR INTERACTION DURING THE SILVER SULFIDE NANOPARTICLES FORMATION BY BACTERIAL SYNTHESIS

Plastun I.L., Zakharov A.A., Naumov A.A.

Y. Gagarin Saratov State Technical University

Politechnicheskaya str., 77, Saratov, 410054, Russia; e-mail: inna_pls@mail.ru

Abstract. The intermolecular interaction of protein structures with working solution salts used to produce silver sulfide nanoparticles by biosynthesis using gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* 168 is studied using quantum chemical molecular modeling methods. One of bacterial synthesis defining components is the flagellin protein, which can self-organize into hollow cylindrical structures and, as shown by experimental studies, is the only protein adsorbed on resulting nanoparticles surface during synthesis based on *Bacillus subtilis* 168. The studied objects were AgNO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ salts involved in the synthesis process, and non-standard amino acid methyllysine as a part of flagellin. The study of complexation was based on molecular structures and IR spectra calculation using the Density Functional Theory (DFT) methods with B3LYP functional and base set 6-31G (d) by the Gaussian 09 software package and on analysis of formed hydrogen bonds parameters. During the simulation, it was found that methyllysine forms fairly stable molecular complexes with silver nitrate AgNO_3 and sodium thiosulfate $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. This makes it possible to talk about the significant role of methyllysine in silver sulfide nanoparticles formation and clarifies the mechanism of its functioning as a part of flagellin.

Key words: *flagellin, methyllysine, silver sulfide nanoparticles, molecular modeling, complex formation, hydrogen bond, density functional theory (DFT).*

АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВЫМ ЭПИЗОДОМ ШИЗОФРЕНИИ

Щербатюк Т.Г.^{1,2,3}, Ляхова А.А.⁴, Жукова Е.С.¹, Жилыева Т.В.⁴, Пятойкина А.С.⁵, Семенов И.В.⁵, Цвет А.Л.⁴, Гапеев А.Б.^{3,6}

¹ ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора
ул. Семашко, 20, г. Нижний Новгород, 603005, РФ; e-mail: evgenya_plekhanova@mail.ru;

² ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»
Проспект Науки, 3, г. Пуццо, 142290, РФ; e-mail: ozone_stg@mail.ru

³ ГОУ ВО Московской области «Московский государственный областной университет»
ул. Веры Волошиной, 24, г. Мытищи, РФ; e-mail: ozone_stg@mail.ru

⁴ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
пл. Минина и Пожарского, 10/1, г. Нижний Новгород, 603005, РФ; e-mail: anastasyalyakhova@yandex.ru

⁵ ГБУЗ НО «Клиническая психиатрическая больница № 1»

ул. Ульянова, 41, г. Нижний Новгород, 603155, РФ e-mail: annapiatoikina@yandex.ru

⁶ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

г. Пуццо, РФ; e-mail: a_b_g@mail.ru.

Поступила в редакцию: 12.07.20

Аннотация. Шизофрения считается мультифакториальной патологией, ассоциированной с генетической предрасположенностью, нейрохимическими нарушениями и другими патологическими процессами, в частности, предположительно, с нарушениями процессов свободнорадикального окисления. В настоящее время в практической психиатрии не существует общепринятых биохимических маркеров оценки окислительного статуса больных шизофренией. В статье представлены результаты исследования активности процессов свободнорадикального окисления у 20 пациентов с первым эпизодом шизофрении. Определяли уровень спонтанного и металл-катализируемого окисления белков плазмы крови, активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах и концентрацию глутатиона в плазме крови. У всех пациентов, независимо от пола и возраста, выявлены статистически значимое повышение степени металл-катализируемого окисления белков плазмы крови и снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах. У пациентов мужского пола зарегистрирован достоверно сниженный уровень глутатиона в плазме крови по сравнению с контрольной группой. Таким образом, в результате исследования у пациентов с первым эпизодом шизофрении было установлено наличие окислительного стресса, снижение резервно-адаптационных возможностей организма, ослабление активности ферментативной и неферментативной систем антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: шизофрения, окислительный стресс, окислительная модификация белков, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что риск возникновения шизофрении во многом связан с наследственной предрасположенностью, генетические факторы являются лишь предрасполагающей, при этом патогенез шизофрении во многом связан с развитием целого ряда патофизиологических нарушений [1,2]. В настоящее время исследователи уделяют большое внимание изучению активности свободнорадикальных процессов у больных шизофренией, считая нарушения этих процессов одним из ключевых механизмов патогенеза шизофрении [3,4]. Мозг является наиболее метаболически активной частью организма, он использует около 25% кислорода. В связи с этим, а также с наличием дефектов в работе электрон-транспортной цепи митохондрий, нарушением работы митохондрий [5] и нейротрансмиттерных систем [6], в мозге генерируется большое количество свободных радикалов (СР) и активных форм кислорода (АФК).

При нарушении баланса про- и антиоксидантов вследствие повышенной продукции СР в организме развивается окислительный стресс (ОС). Особенно сильно подвержены окислению белки, благодаря наличию в своем составе боковых радикалов сульфидных, аминных, цистеиновых и метиониновых групп. Эти группировки очень чувствительны к АФК и СР, действие которых вызывает разрушение пептидных связей, образование поперечных сшивок между белками или между аминокислотами в молекуле белка, а также модификацию боковых радикалов аминокислот. В результате этого происходит нарушение третичной структуры белков, их агрегация и денатурация. С этими процессами связывают конформационные перестройки мембран, дисфункцию ионных каналов, рецепторов и ферментов [7].

Содержание белковых карбонильных производных является важным маркером ОС, в том числе и у больных шизофренией [8, 9]. При исследовании состояния ОС чаще всего используют именно определение концентрации карбонильных производных белков в плазме крови, так как СО-группы относительно стабильны и присутствуют уже на ранних этапах ОС. Карбонилированные белки образуются путем прямого окисления боковых радикалов

аминокислот, либо с участием непредельных альдегидов или продуктов перекисного окисления липидов, а также при металл-катализируемом окислении [8, 10]. Считается, что маркеры ОС, такие как степень окислительной модификации белков (ОМБ), могут быть важными показателями течения шизофрении и предоставлять информацию о прогрессировании заболевания и эффективности лечения [4].

Было установлено, что у больных шизофренией в мозге и спинномозговой жидкости наблюдалось гиперкарбонилирование белка - медиатора коллапсного ответа CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein-2) [11]. Сообщается, что CRMP2 участвует в регуляции синаптической передачи, контроле динамики и модулирования транспорта везикул [12]. Зарегистрирован повышенный уровень модифицированных белков в группе пациентов с острым приступом шизофрении разной формы (параноидальная, недифференцированная и другие) по сравнению с группой условно здоровых добровольцев, однако у пациентов в стадии ремиссии наблюдался более низкий уровень окисленных белков, сравнимый с таковым в контрольной группе [13]. Повышенное содержание карбонилированных белковых производных у больных с различными формами шизофрении обнаружено в ряде работ [14-16]. Таким образом, показатель степени ОМБ является важнейшим биомаркером ОС при шизофрении. У больных отмечается повышенный уровень карбонильных белковых производных, однако это в основном касается поздних стадий заболевания.

Окислительный стресс может быть результатом как увеличения выработки СР и АФК, так и снижения активности антиоксидантных ферментов [17]. Известно, что первичный этап защиты организма от воздействия СР и АФК осуществляет супероксиддисмутаза (СОД), катализирующая реакцию дисмутации супероксидных анион-радикалов с образованием кислорода и пероксида водорода [18]. Каталаза, восстанавливающая H_2O_2 , катализирует гетеролитическое расщепление О-О-связи в H_2O_2 и, таким образом, является синергистом супероксиддисмутазы в клетке [18]. Повышенная опасность развития ОС в клетках и тканях нервной системы определяется высокой интенсивностью метаболизма, высоким содержанием липидов - субстрата перекисного окисления липидов, способностью нейромедиаторов окисляться с образованием АФК, повышенным содержанием связанных ионов железа [19]. В головном мозге главным источником H_2O_2 является моноаминоксидазная реакция, осуществляемая моноаминоксидазами А и В, которые присутствуют в нейронах и астроглии [20].

Несмотря на многочисленные исследования, не удалось установить закономерности изменения активности антиоксидантных ферментов при шизофрении. Повышенная активность СОД в эритроцитах у пациентов с хронической шизофренией и длительным антипсихотическим лечением показана в работах [21-23]. Повышенная активность каталазы зарегистрирована в сыворотке крови [24, 25], однако активность СОД при этом была снижена. Обнаружена повышенная активность каталазы в эритроцитах у больных шизофренией [26]. Ряд исследователей отмечают снижение активности СОД и каталазы у больных шизофренией [27-29]. Полученные противоречивые сведения об активности СОД и каталазы могут быть связаны с несколькими факторами, такими как различия в методиках измерения, эффектах нейролептиков, подходах к включению в исследование пациентов на различных стадиях заболевания, этиологии заболевания и этническом происхождении, образе жизни, месте проживания и характере питания [30].

Основным антиоксидантом мозга является глутатион. Он представляет собой трипептид, состоящий из остатков цистеина, глутаминовой кислоты и глицина. Благодаря наличию SH-групп, глутатион взаимодействует с АФК и СР, восстанавливая их до нетоксичных продуктов [31]. Низкий уровень глутатиона обнаруживается у пациентов с различными формами шизофрении [32, 33]. Однако в некоторых работах не выявлено различий между уровнями глутатиона волонтеров и пациентов с шизофренией [34].

В связи с противоречивостью сведений о состоянии свободнорадикальных процессов у пациентов с шизофренией целью настоящей работы являлась оценка окислительной модификации белков, активности антиоксидантных ферментов и концентрации глутатиона в крови больных с первыми эпизодами шизофрении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили образцы крови 20-ти пациентов с первым эпизодом шизофрении в возрасте от 18 до 42 лет. Все пациенты находились на обследовании и лечении в ГБУЗ НО «Клиническая психиатрическая больница № 1 города Нижнего Новгород». Контрольную группу составляли образцы крови 20-ти условно здоровых добровольцев соответствующего возраста и пола. Все пациенты, включенные в исследование, обследованы с помощью батареи валидизированных психометрических инструментов вслепую к данным анализа биообразцов.

Степень ОМБ оценивали по методу Levine R.L. [35] в модификации Дубининой Е.Е. [36], основанному на определении содержания карбонильных производных в плазме крови, образующихся в результате спонтанного и металл-катализируемого окисления (МКО) аминокислотных остатков в белковой молекуле СР или АФК. Образовавшиеся карбонильные производные могут количественно реагировать с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием альдегид- и кетон-2,4-динитрофенилгидразонов (АДНФГ и КДНФГ соответственно). Концентрацию АДНФГ и КДНФГ определяли спектрофотометрически при длине волны 363 нм и 240 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против контрольной пробы.

Активность СОД в гемолизате эритроцитов оценивали по методу, основанному на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся в результате взаимодействия восстановленной формы НАДН₂ и феназинметасульфата. Количественные параметры протекающей реакции

определяли путем измерения оптической плотности реакционной смеси при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против смеси, не содержащей НАДФН. Об активности каталазы в гемолизате эритроцитов судили по изменению концентрации пероксида водорода в пробе за 20 с [36].

Забор крови для оценки уровня глутатиона в плазме проводился в день психопатологического обследования утром натощак. Содержание глутатиона оценивали методом, основанным на способности сульфгидрильной группы глутатиона вступать в реакцию с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБК), при этом образуется окрашенное соединение - 2-нитро-5-тиобензойная кислота [37].

Статистический анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при нормальном распределении данных по тесту Колмогорова-Смирнова ($p < 0,05$) и *U*-критерия Манна-Уитни при отличном от нормального распределении данных ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что из 4 регистрируемых параметров ОМБ – спонтанные и металл-катализируемые АДНФГ и КДНФГ, только концентрация АДНФГ при МКО статистически значимо различалась (рисунок 1). По сравнению с условно здоровыми волонтерами у больных с первым эпизодом шизофрении, независимо от возраста и пола, обнаружена повышенная концентрация АДНФГ (рисунок 1). Образование АДНФГ и КДНФГ является важным показателем ОС. Согласно Дубининой Е.Е. и др. [38], АДНФГ является маркером фрагментации белков с дальнейшим образованием низкомолекулярных фрагментов и преобладает на ранних этапах ОС; КДНФГ – маркер агрегации белков, его преобладание свидетельствует о поздних стадиях ОС. Можно сделать вывод о том, что больные с первым эпизодом шизофрении находятся на начальной стадии ОС, когда наблюдается лишь фрагментация белков, и при этом еще не происходят необратимые структурные нарушения, приводящие к накоплению агрегированных белковых форм.

Известно, что МКО рассматривается как вид посттрансляционной модификации белков и выполняет важную роль в организме при патологических состояниях [38]. Усиление МКО, обнаруженное в настоящем исследовании, говорит об истощении резервных возможностей организма.

В ходе исследования у больных шизофренией была проведена оценка активности антиоксидантных ферментов. Статистический анализ проводили отдельно в группах пациентов мужского и женского пола, так как, согласно литературным данным, предполагаются гендерные особенности активности антиоксидантной системы защиты. Известно, что эстрадиол обладает антиоксидантными свойствами [39, 40], которые обусловлены наличием в его молекуле фенольной группировки. Антиоксидантный эффект также обнаружен у пролактина [41]. Настоящее исследование показало, что как у мужчин, так и у женщин, больных шизофренией, наблюдается пониженная активность СОД и каталазы по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Низкая активность СОД и каталазы при шизофрении объясняется мутациями и окислительной деструкцией, а также ингибирующим действием АФК. Пероксид водорода может тормозить активность СОД, а супероксидный радикал – активность каталазы [18]. Активность СОД может быть снижена в результате гликирования, а также нитрования тирозиновых остатков фермента пероксинитритом, образованным в реакции между супероксидным радикалом и оксидом азота [10]. Низкая активность антиоксидантных ферментов может обуславливаться генетическим фактором. Известна множественность форм Cu,Zn-СОД [19], показано, что полиморфизм гена, кодирующего Mn-СОД, связан с риском развития шизофрении [42]. Выявлено несколько аллельных вариантов гена каталазы, ассоциированных со снижением каталитической активности фермента [43]. Стоит отметить, что низкая активность каталазы может быть связана с концентрацией НАДФН. Известно, что каталаза для проявления своей активности не нуждается в НАДФН. Однако каталаза имеет аллостерический центр, который связывает НАДФН, что поддерживает фермент в нормальном конформационном активном состоянии [19].

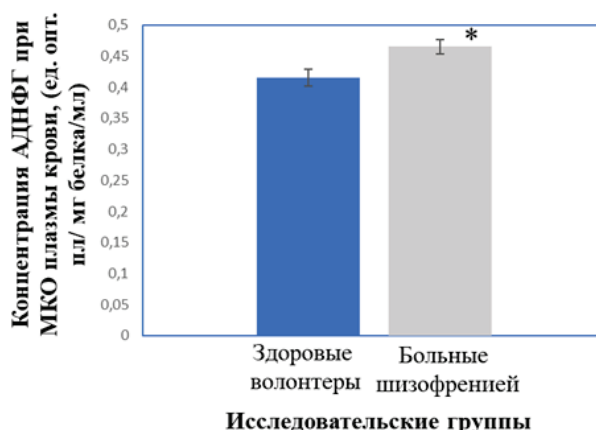


Рисунок 1. Уровень АДНФГ при металл-катализируемом окислении белков плазмы крови у пациентов с первым эпизодом шизофрении и условно здоровых волонтеров. * – статистически значимые различия по сравнению с группой условно здоровых добровольцев по *t*-критерию Стьюдента, $p < 0,01$

Таблица 1. Активность СОД и каталазы в эритроцитах мужчин и женщин, больных шизофренией, и условно здоровых волонтеров

	Активность СОД, ед.акт./г Hb		Активность каталазы, ед.акт./г Hb	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины
Условно здоровые добровольцы	234 [136; 321]	180 [165; 220]	73 [38; 94]	70 [36; 95]
Пациенты с первым эпизодом шизофрении	128 [118; 146]*	129 [103; 146]*	19 [13; 40]*	24 [5; 39]*

* – статистически значимые различия по сравнению с группой условно здоровых добровольцев по *U*-критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$

Можно полагать, что сниженная активность каталазы, установленная в нашем исследовании, в определенной степени связана с низкой концентрацией восстановленного НАДФН.

В ходе исследования была проведена оценка уровня глутатиона. У больных мужского пола с первым эпизодом шизофрении была зарегистрирована пониженная концентрация восстановленного глутатиона по сравнению с условно здоровыми волонтерами (рис. 2).

У пациентов женского пола достоверных различий в уровне глутатиона по сравнению со здоровыми волонтерами не обнаружено (рис. 2). Как известно, низкий уровень глутатиона считают одним из главных показателей окислительного стресса при шизофрении [32]. Снижение уровня глутатиона может быть связано с нарушением работы генов ключевых ферментов его синтеза, а также с нарушением экспрессии этих генов. Например, дефекты в гене глутаматцистеинлигазы повышают риск развития шизофрении. Известно также, что на синтез глутаматцистеинлигазы могут влиять NMDA-рецепторы глутамата, играющие важную роль в патогенезе шизофрении. Их гипофункция способствует подавлению транскрипции каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы, а также и самого фермента. Кроме того, при шизофрении также отмечается угнетение экспрессии генов и второго ключевого фермента синтеза глутатиона - глутатионсинтетазы [33, 44]. Повышенная генерация СР и АФК также является причиной низкого уровня глутатиона в крови, так как при этом весь восстановленный глутатион активно расходуется на нейтрализацию высоко реакционноспособных молекул и превращается в окисленный. Соответственно, содержание восстановленного глутатиона в крови снижается. Низкая концентрация глутатиона у мужчин, предположительно, ассоциирована с выраженной психотической симптоматикой, а также тяжестью негативных симптомов (социальная отгороженность, притупленный аффект, отсутствие мотивации и бедность речи), что может способствовать угнетению антиоксидантной системы. Установлено, что у женщин наблюдаются более слабые проявления этих симптомов шизофрении [45]. Несмотря на это, в настоящее время все чаще пониженные концентрации глутатиона ассоциируют с недостатком аминокислоты цистеина, низкие уровни которого ограничивают синтез антиоксиданта. Поэтому, существует терапевтический механизм регуляции синтеза глутатиона с целью ослабления ОС при помощи препаратов, содержащих цистеин, для повышения концентрации антиоксиданта.

Таким образом, в результате исследования у больных с первым эпизодом шизофрении было установлено наличие ОС, снижение резервно-адаптационных возможностей организма, ослабление активности ферментативной и неферментативной систем антиоксидантной защиты. Об этом свидетельствует повышенное содержание АДНФГ при металл-катализируемом окислении белков плазмы крови, снижение активности СОД и каталазы, а также уровня глутатиона.

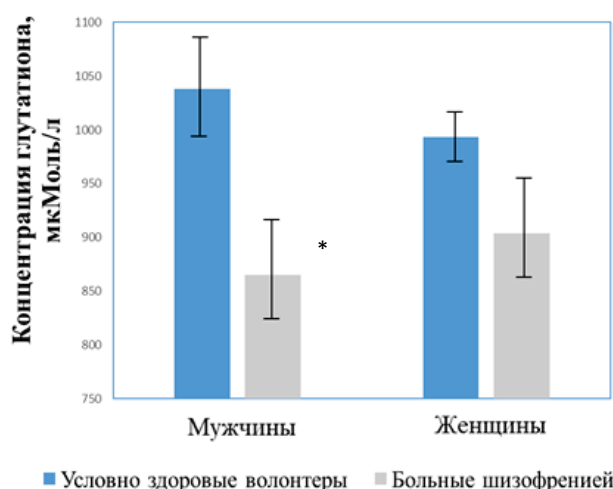


Рисунок 2. Концентрация глутатиона в крови пациентов с первым эпизодом шизофрении и условно здоровых волонтеров. * – статистически значимые различия по сравнению с группой условно здоровых добровольцев по *t*-критерию Стьюдента, $p < 0,01$

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-015-00420 (руководитель Мазо Г.Э.).

Список литературы / References:

1. Хоменко Н.В. Генетические и средовые факторы в развитии шизофрении. *Медицинский журнал*, 2012, № 2, с. 15-18. [Homenko N.V. Genetic and environmental factors in the development of schizophrenia. *Medical journal*, 2012, no. 2, pp. 15-18. (In Russ.)]
2. Ripke S. Biological insights from 108 schizophrenia associated genetic loci. *Nature*, 2014, vol. 511, pp. 421-427.
3. Maas D.A., Vallès A., Martens G.J.M. Oxidative stress, prefrontal cortex hypomyelination and cognitive symptoms in schizophrenia. *Translational psychiatry*, 2017, vol. 7, no. 7, pp. 1-10.
4. Kim E., Keskey Z., Kang M., Kitchen C., Bentley W.E. Chen S., Kelly D.L., Payne G.F. Validation of oxidative stress assay for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 2019, no. 212, pp. 126-133.
5. Zuccoli G.S., Saia-Cereda V.M., Nascimento J.M., Martins-de-Souza D. The Energy Metabolism Dysfunction in Psychiatric Disorders Postmortem Brains: Focus on Proteomic Evidence. *Frontiers in Neuroscience*, 2017, vol. 11, no. 493, pp. 1-14.
6. Grace A.A., Gomes F.V. The circuitry of dopamine system regulation and its disruption in schizophrenia: insights into treatment and prevention. *Schizophrenia Bulletin*, 2019, vol. 45, no. 1, pp. 148-157.
7. Полимova А.М. Роль свободных радикалов в развитии нейродегенеративных процессов в ткани мозга и методы оценки окислительного стресса при болезни Паркинсона: диссертация. М. 2015, 129 с. [Polimova A.M. The role of free radicals in the development of neurodegenerative processes in brain tissue and methods for assessing oxidative stress in Parkinson's disease: dissertation. M. 2015, 129 p. (In Russ.)]
8. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях. *Биомедицинская химия*, 2007, т. 53, № 4, с. 351-372. [Dubinina E.E., Pustygina A.V. Free radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological conditions. *Biomedical chemistry*, 2007, vol. 53, no. 4, pp. 351-372. (In Russ.)]
9. Dietrich-Muszalska A. Oxidative Stress in Schizophrenia. *Studies on Psychiatric Disorders*, 2014, vol. 9, no. 2, pp. 43-72.
10. Bryll A., Skrzypek J., Krzyściak W., Szelągowska M., Smierciak N., Kozicz T., Popiela T. Oxidative-Antioxidant Imbalance and Impaired Glucose Metabolism in Schizophrenia. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 384, pp. 1-40.
11. Andreazza A.C., Wang J.F., Salmasi F., Shao L., Young L.T. Specific subcellular changes in oxidative stress in prefrontal cortex from patients with bipolar disorder. *Journal of Neurochemistry*, 2013, vol. 127, pp. 552-561.
12. Toyoshima M., Jiang X., Ogawa T., Ohnishi T., Yoshihara S., Balan S., Yoshikawa T., Hirokawa N. Enhanced carbonyl stress induces irreversible multimerization of CRMP2 in schizophrenia pathogenesis. *Life Science Alliance*, 2019, vol. 2, no. 5, pp. 1-18.
13. Tunçel O., Sarisoy G., Bilgici B., Bilgici B., Pazvantoglu O., Çetin E., Unverdi E., Avcı B., Boke O., Oxidative stress in bipolar and schizophrenia patients. *Psychiatry Research*, 2015, vol. 228, no. 3, pp. 688-694.
14. Dietrich-Muszalska A., Malinowska J., Olas B., Glowacki R., Bald E., Wachowicz B., Rabe-Jabłońska J. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients. *Neurochemical Research*, 2012, vol. 37, no. 5, pp. 1057-1062.
15. Pedrini M., Massuda R., Fries G.R., Pasquali M.B., Schnorr E., Moreira J.C., Teixeira A.L., M.I. Lobato, Walz J.C., Belmonte-de-Abreu P.S., Kauer-Sant'Anna M., Kapczinski F., Gama C.S. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *Journal of Psychiatric Research*, 2012, vol. 46, pp. 819-824.
16. Boskovic M., Grabnar I., Terzic T., Plesnicar B.K., Vovk T. Oxidative stress in schizophrenia patients treated with long-acting haloperidol decanoate. *Psychiatry Research*, 2013, vol. 210, no. 3, pp. 761-768.
17. Wood S.J., Yücel M., Pantelis C., Berk M. Neurobiology of Schizophrenia Spectrum Disorders: The Role of Oxidative Stress. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 2009, vol. 38, no. 5, pp. 396-401.
18. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. *Прооксиданты и антиоксиданты*. М.: Фирма «Слово», 2006. 556 с. [Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovyh N.F., Trufakin V.A. Okislitel'nyj stress. *Prooksidanty i antioksidanty*. M.: Firma «Slovo», 2006, 556 p. (In Russ.)]
19. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. *Патологические состояния и заболевания*. Новосибирск: АРТА, 2008, 284 с. [Men'shchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar' I.A., Trufakin V.A. Okislitel'nyj stress. *Patologicheskie sostoyaniya i zabolevaniya*. Novosibirsk: ARTA, 2008, 284 p. (In Russ.)]
20. Иванова С.А., Смирнова Л.П., Щигорева Ю.Г., Бойко А.С., Семке А.В., Узбеков М.Г., Бохан Н.А. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы в эритроцитах больных шизофренией в динамике фармакотерапии традиционными антипсихотическими препаратами. *Клиническая нейрохимия*, 2014, т. 31, № 1, с. 79-83. [Ivanova S.A., Smirnova L.P., Shchigoreva Yu.G., Boyko A.S., Semke A.V., Uzbekov M.G., Bohan N.A. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase in red blood cells of patients with schizophrenia in the dynamics of pharmacotherapy with traditional antipsychotic drugs. *Clinical Neurochemistry*, 2014, vol. 31, no. 1, pp. 79-83. (In Russ.)]

21. Zhang X.Y., Zhou D.F., Cao L.Y., Zhang P.Y., Wu G.Y. Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Research*, 2003, vol. 117, pp. 28-34.
22. Miljevic C., Nikolic M., Nikolic-Kokic A., Jones D.R., Niketic V., Lecic-Tosevski D., Spasic M.B. Lipid status, anti-oxidant enzyme defence and haemoglobin content in the blood of long-term clozapine-treated schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2010, vol. 34, no. 2, pp. 303-307.
23. Sarandol A., Sarandol E., Acikgoz H.E., Eker S.S., Akkaya C., Dirican M. First-episode psychosis is associated with oxidative stress: Effects of short-term antipsychotic treatment. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 2015, vol. 69, pp. 699-707.
24. Atmaca M., Tezcan E., Kuloglu M., Ustundag B., Kirtas O. The effect of extract of ginkgo biloba addition to olanzapine on therapeutic effect and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 2005, vol. 59, pp. 652-656.
25. Asmari A.K., Khan M.W. Inflammation and schizophrenia: alterations in cytokine levels and perturbation in antioxidative defense systems. *Human and experimental toxicology*, 2014, vol. 33, no. 2, pp. 115-122.
26. Ruiz-Litago F., Seco J., Echevarría E., Martínez-Cengotitabengoa M., Gil J., Irazusta J., González-Pinto A.M. Adaptive response in the antioxidant defence system in the course and outcome in first-episode schizophrenia patients: A 12-months follow-up study. *Psychiatry Research*, 2012, vol. 200, no. 2-3, pp. 218-222.
27. Bai Z.L., Li X.S., Chen G.Y., Du Y., Wei Z.X., Chen X., Zheng G.E., Deng W., Cheng Y. Serum oxidative stress marker levels in un-medicated and medicated patients with schizophrenia. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, vol. 10, pp. 1-9.
28. Иванов М.В., Щедрина Л.В., Тархова Ю.И., Ещенко Н.Д., Дагаев С.Г. Диагностика и коррекция нарушений окислительного статуса у пациентов с шизофренией. *Медицинский алфавит*, 2018, № 1, с. 50-55. [Ivanov M.V., Shchedrina L.V., Tarkhova Yu.I., Yeshenko N.D., Dagaev S.G. Diagnosis and correction of oxidative status disorders in patients with schizophrenia. *Medical Alphabet*, 2018, no. 1, pp. 50-55. (In Russ.)]
29. Wei C.W., Sun Y., Chen N., Chen S., Xiu M., Zhang X. Interaction of oxidative stress and BDNF on executive dysfunction in patients with chronic schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, vol. 111, pp. 1-7.
30. Орлов В.А. Закономерности свободнорадикальных процессов при шизофрении. *Фундаментальные исследования*, 2012, № 8, с. 215-219. [Orlov V.A. Patterns of free radical processes in schizophrenia. *Basic Research*, 2012, no. 8, pp. 215-219. (In Russ.)]
31. Луцкий М.А., Куксова Т.В., Смелянец М.А., Лушникова Ю.П. Активность эндогенной системы антиоксидантной защиты в процессе жизнедеятельности организма. *Медицинские науки*, 2014, № 12, с. 21-23. [Lutsky M.A., Kuksova T.V., Smelyanets M.A., Lushnikova Yu.P. The activity of the endogenous system of antioxidant defense in the process of vital activity of the body. *Medical Sciences*, 2014, no. 12, p. 21-23. (In Russ.)]
32. Das T.K., Javadzadeh A., Dey A., Sabesan P., Theberge J., Radua J., Palaniyappan L. Antioxidant defense in schizophrenia and bipolar disorder: A meta-analysis of MRS studies of anterior cingulate glutathione. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2018, vol. 8, pp. 1-9.
33. Tsugawa S., Noda Y., Tarumi R., Mimura Y., Yoshida K., Iwata Y., Elsalhy M., Kuromiya M., Kurose S., Masuda F., Morita S., Ogyu K., Plitman E., Wada M., Miyazaki T., Graff-Guerrero A., Mimura M., Nakajima S. Glutathione levels and activities of glutathione metabolism enzymes in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychopharmacology*, 2019, vol. 33, no. 10, pp. 1199-1214.
34. Fraguas D, Diaz-Caneja C.M., Ayora M., Hernandez-Alvarez F., Rodríguez-Quiroga A., Recio S., Leza J.C., Arango C. Oxidative stress and inflammation in first-episode psychosis: A systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin*, 2018, vol. 125, pp. 1-10.
35. Levine R.L., Carland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 186, pp. 464-478.
36. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения. *Вопросы медицинской химии*, 1995, т. 41, № 1, с. 24-26. [Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. Oxidative modification of human serum proteins. Methods for its determination. *Questions of medical chemistry*, 1995, vol. 41, no. 1, p. 24-26. (In Russ.)]
37. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. Санкт-Петербург: ИКФ Фолиант, 2000, 104 с. [Harutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. *Methods for assessing free radical oxidation and the body's antioxidant system: guidelines*. St. Petersburg: IKF Foliant, 2000, 104 p. (In Russ.)]
38. Дубинина Е.Е., Морозова М. Г., Леонова Н.В., Гампер Н.Л., Солитернова И.Б., Нуллер Ю.Л., Бутома Г.Б., Ковругина С.В. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация). *Вопросы медицинской химии*, 2000, т. 46, № 4, с. 398-409. [Dubinina E.E., Morozova M.G., Leonova N.V., Gamper N.L., Soliternova I.B., Nuller Yu.L., Butoma G.B., Kovrugina S.V. Oxidative modification of plasma proteins in patients with mental disorders (depression, depersonalization). *Questions of medical chemistry*, 2000, vol. 46, no. 4, pp. 398-409. (In Russ.)]
39. Янковская А.Г. Гормональные нарушения гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси у женщин с шизофренией. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, 2015, № 4, с. 5-9. [Yankouskaya A. H. Hormonal abnormalities of hypothalamic-pituitary-gonadal axis in women with schizophrenia. *Journal of Grodno State Medical University*, 2015, no. 4, pp. 5-9. (In Russ.)]

40. Янковская А.Г. Нейробиологические механизмы влияния эстрогенов на патогенез шизофрении. Психиатрия. Психотерапия и клиническая психология: материалы конференции, посвященной 90-летию кафедры психиатрии и медицинской психологии Белорусского государственного медицинского университета. Минск: Профессиональные издания, 2015, с. 252-254. [Yankovskaya A.G. Neurobiological mechanisms of the influence of estrogen on the pathogenesis of schizophrenia. Psychiatry. Psychotherapy and clinical psychology: proceedings of a conference dedicated to the 90th anniversary of the Department of Psychiatry and Medical Psychology of the Belarusian State Medical University. Minsk: Professional Publications, 2015, pp. 252-254. (In Russ.)]
41. Rivero-Segura N.A., Coronado-Mares M.I., Rincón-Heredia R., Pérez-Torres I., Montiel T., Pavon N., Cabrera-Reyes E.A., Massieu L., Cerbon M. Prolactin prevents mitochondrial dysfunction induced by glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, vol. 701, pp. 58-64.
42. Wang D.F., Cao B., Xu M.Y., Liu Y.Q., Yan L.L., Liu R., Wang J.Y., Lu Q.B. Meta-Analyses of Manganese Superoxide Dismutase Activity, Gene Ala-9Val Polymorphism, and the Risk of Schizophrenia. *Medicine*, 2015, vol. 94, no. 36, pp. 1-7.
43. Колесникова Л.И., Байрова Т.А., Первушина О.А. Гены ферментов антиоксидантной системы. Вестник РАМН, 2013, № 12, с. 83-88. [Kolesnikova L.I., Bairova T.A., Pervushina O.A. Antioxidant system enzyme genes. *Vestnik RAMS*, 2013, no. 12, pp. 83-88. (In Russ.)]
44. Xin L., Mekle R., Fournier M., Baumann P.S., Ferrari C., Alameda L., Jenni R., Lu H., Schaller B., Cuenod M., Conus P., Gruetter R., Do K.Q. Genetic polymorphism associated prefrontal glutathione and its coupling with brain glutamate and peripheral redox status in early psychosis. *Schizophrenia Bulletin*, 2016, vol. 42, no. 5, pp. 1185-1196.
45. Mendrek A., Mancini-Marie A. Sex/gender Differences in the Brain and Cognition in Schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2016, vol. 67, pp. 57-78.

ACTIVITY OF FREE RADICAL PROCESSES IN PATIENTS WITH FIRST EPISOD OF SCHIZOPHRENIA

Shcherbatyuk T.G.^{1,2,3}, Lyakhova A.A.⁴, Zhukova E.S.¹, Zhilyaeva T.V.⁴, Pyatyakina A.S.⁵, Semennov I.V.⁵
Gapeyev A.B.^{3,6}

¹ Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology
st. Semashko, 20, Nizhny Novgorod, 603005, Russia; e-mail: evgenya_plekhanova@mail.ru;

² Pushchino State Institute of Natural Science
Prospekt Nauki, 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: ozone_stg@mail.ru;

³ Moscow State Regional University
st. Vera Voloshina, 24, Mytishchi, Russia; e-mail: ozone_stg@mail.ru;

⁴ Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
Minin and Pozharsky Sq., 10/1, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: anastasyalyakhova@yandex.ru

⁵ Clinical Psychiatric Hospital No. 1
st. Ulyanova, 41, Nizhny Novgorod, 603155, Russia; e-mail: annapiatoikina@yandex.ru

⁶ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Institutskaya str. 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: a_b_g@mail.ru

Abstract. Schizophrenia is by far the most common mental illness. This mental disorder is considered a multifactorial pathology associated not only with a genetic predisposition and neurochemical defects, but also, presumably, with impaired free radical oxidation processes. Currently, in practical psychiatry, there are no generally accepted biochemical markers for assessing the oxidative status of patients with schizophrenia. The article presents the results of a study of the activity of free radical oxidation processes in 20 patients with the first episodes of schizophrenia. The activity of spontaneous and metal-catalyzed oxidation of blood plasma proteins was evaluated, the degree of activity of superoxide dismutase and catalase in red blood cells was determined, and the level of glutathione in blood plasma was estimated. All patients, regardless of gender and age, showed a statistically significant increase in the degree of metal-catalyzed oxidation of plasma proteins and a decrease in the activity of superoxide dismutase and catalase. In male patients, a significantly reduced level of glutathione in plasma was recorded in comparison with the control group. Thus, the results obtained in patients with the first episodes of schizophrenia showed the presence of oxidative stress, decreased reserve-adaptive capabilities of the body, and the weakening of the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems.

Key words: schizophrenia, oxidative stress, oxidative protein modification, superoxide dismutase, catalase, glutathione.

ДИФФУЗИЯ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В АЛЬГИНАТ-ЖЕЛАТИНОВОМ ГИДРОГЕЛЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕПСИНА

Черенков И.А., Березина Л.С., Кривилев М.Д., Сергеев В.Г.

Удмуртский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 13.07.20

Аннотация. Исследование посвящено электрохимическим процессам в гидрогелевых средах. В работе рассматривается электрохимическая модель диффузии электроактивного фенотиазинового красителя толуидинового синего (ТС) в среде комбинированного альгинат-желатинового геля при пепсиновом протеолизе. Представлены данные циклической вольтамперометрии (ЦВА) красителя в кислой среде. Проведен расчет коэффициента диффузии ТС. Показаны качественные и количественные изменения кривых ЦВА по отношению к данным, полученным в нейтральной среде. Методом ЦВА изучена диффузия красителя в гидрогелях различного состава. Проведены расчеты коэффициента диффузии ТС в гелевых средах при различных соотношениях альгинат/желатин. Выяснено влияние состава гидрогеля на характер вольтамперных кривых, характеризующих окислительно-восстановительные превращения электроактивной метки. Электрохимическое поведение толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле с соотношением компонентов 1:3 в присутствии пепсина характеризуется значением разности потенциалов пиков окисления и восстановления $\Delta E = 120,3$ мВ, а также соотношением пиковых токов: $I_{p^{ox}}/I_{p^{red}} = 1,08$ при $I_{p^{red}} = 8,99$ мкА и $I_{p^{ox}} = 9,70$ мкА, что приближает систему к обратимому электрохимическому поведению. Внесение пепсина приводит к ускорению диффузии красителя, количественно выраженному в динамике значений силы тока и соответствующему росту значения эффективного коэффициента диффузии. Разработанная модель может быть использована для имитации *in electrode* элементов воспалительных реакций, исследования качества ферментных препаратов, оценки диффузионных свойств различных гелеобразователей и их устойчивости к протеолизу.

Ключевые слова: толуидиновый синий, пепсин, желатин, альгинат, циклическая вольтамперометрия.

Одним из направлений биоэлектрохимии является создание электрохимических моделей биологических процессов [1, 2]. При моделировании систем с участием иммобилизованных в гидрогеле клеток или использовании тканеинженерных конструкций возникает необходимость учета влияния диффузионных ограничений гелевых сред на электрохимические процессы [2-5]. Фундаментальным аспектом проблемы является интерес к гидрогелям как к возможной первооснове жизни [6] и эквивалентам биологических тканей [4, 7]. В ряде случаев на диффузию электроактивных компонентов в гидрогелях оказывают влияние ферменты, продуцируемые иммобилизованными клетками, в частности протеазы [4, 8, 9]. Практической точки зрения, оценка протеазной активности важна, например, для моделирования воспаления и канцерогенеза в клинических и экспериментальных исследованиях [10, 11], моделировании резорбции тиреоглобулина в щитовидной железе [12, 13], оценки качества ферментных препаратов и т. д.

Особый интерес, на наш взгляд, представляет исследование протеазной активности в модели электрохимического сенсора с использованием электроактивной метки, диффундирующей к поверхности электрода через белковый гидрогель-субстрат протеазы [2, 8]. Ранее нами был предложен модельный электрохимический интерфейс для оценки активности трипсина, включающий планарный графитовый электрод с нанесенным желатиновым гидрогелем и толуидиновый синий в качестве электроактивной метки [2]. Возник вопрос об универсальности толуидинового синего как электроактивной метки при низких значениях pH, а также возможности применения более стабильного комплексного альгинат-желатинового гидрогеля.

Целью данной работы стало исследование электрохимического поведения толуидинового синего в среде желатин-альгинатного гидрогеля при воздействии пепсина.

В экспериментах использовались планарные электродные системы («Автоком», Москва, Россия), включающие рабочий и вспомогательный электроды – графитовые, электрод сравнения – хлорсеребряный (рис. 1).

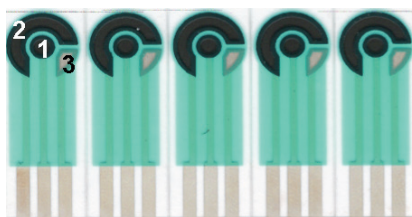


Рисунок 1. Планарная электродная система: 1 – рабочий электрод, 2 – вспомогательный электрод, 3 – электрод сравнения

Перед измерениями электроды подвергали циклированию (+1200...–1200 мВ) в буферном растворе для стабилизации характеристик. Затем на поверхность рабочего электрода наносили рабочие растворы и проводили измерения. Для формирования гидрогеля на рабочий электрод перед измерением наносили 2 мкл смеси желатина (3% масс.) и альгината натрия (2% масс.) в необходимых соотношениях. Для полимеризации альгината использовали 2 М раствор хлорида кальция, наносимый непосредственно на электрод при подготовке. Избыток раствора через некоторое время удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Для формирования нейтральной среды использовали фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,2), кислую среду создавали с помощью буферного раствора глицин-HCl (рН=2,2). В глициновом буфере проводили эксперименты с пепсином.

Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия). Использовались диапазоны потенциалов -800...+800 мВ (отн. Ag/AgCl) со скоростью развертки потенциала от 11 до 98 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводились в течение 40 минут с интервалом в 5 минут. На графиках положительные токи соответствуют процессам электровосстановления, а отрицательные токи – процессам электроокисления. Значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода.

В нейтральной среде толуидиновый синий характеризуется близким к обратимому электрохимическим поведением [2]. При проведении ЦВА в кислой среде (фоновый электролит – буфер глицин HCl, рН = 2,2) происходят качественные изменения вольтамперных кривых ЦВА. В диапазоне значений потенциалов от -800 до 800 мВ ТС в кислой среде формирует пики восстановления и окисления, наблюдаемые при 90 мВ и -100 мВ соответственно. Значения пиковых значений силы тока восстановления составили 5,9 мкА. Для сравнения, в нейтральном электролите, при сохранении прочих условий эксперимента, значения потенциалов пиков составили $E_{p^{ox}} = 235$ мВ; $E_{p^{red}} = 294,9$ мВ; $\Delta E = 59,9$ мВ, а значение силы тока восстановления, при соответствующей скорости развертки потенциала, не превышало 3 мкА [2]. Характерный вид кривой ЦВА ТС в среде глицинового буфера представлен на рисунке 2а.

При анализе зависимости пиковых значений силы тока от скорости развертки потенциала обнаружена линейная зависимость значений силы тока от корня квадратного скорости развертки потенциала, аппроксимирующаяся уравнением:

$$I_{p^{red}} = 0,72\sqrt{v}. \quad (1)$$

Коэффициент $R^2 = 0,99$, что позволяет говорить о диффузионном контроле электрохимического процесса – поступление красителя к электродной поверхности лимитирует формирование тока.

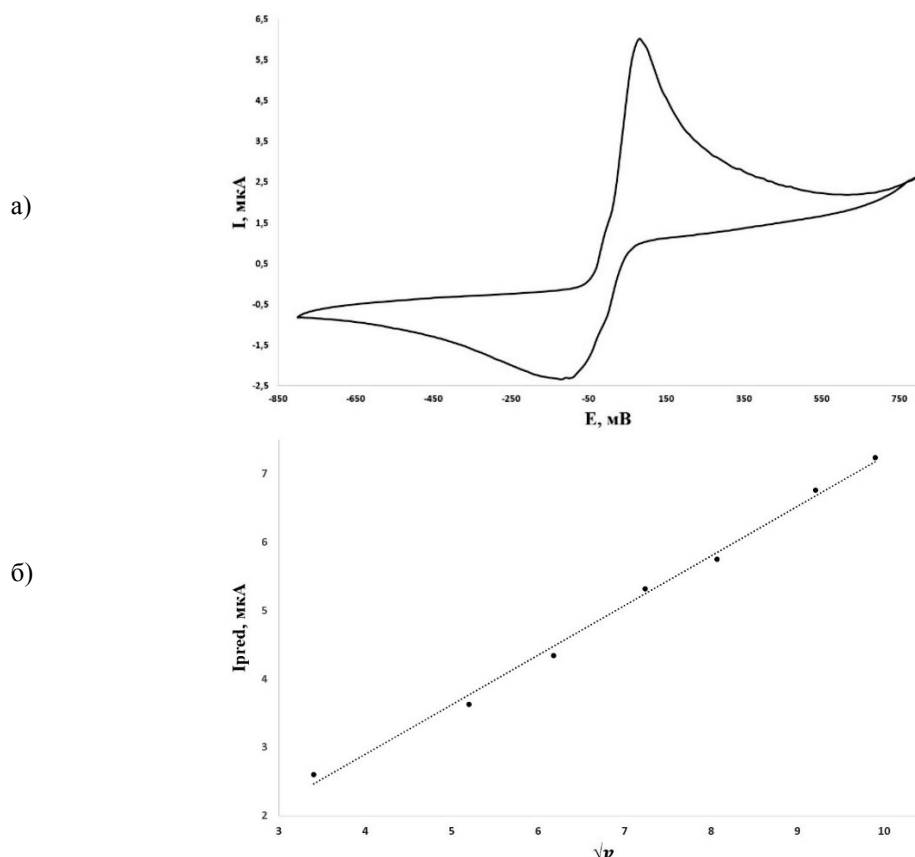


Рисунок 2. Типичная вольтамперограмма ЦВА раствора толуидинового синего (1мМ) в среде глицинового буферного раствора рН 2,2 при скорости сканирования потенциала 65 мВ/с (а); зависимость значений силы тока восстановления от корня квадратного скорости сканирования потенциала

На основе уравнения Рендлса-Шевчика:

$$I_p = -0,446cA\sqrt{\frac{n^3F^3vD}{RT}}, \quad (2)$$

где I_p – пиковые значения силы тока (А); c – концентрация толудинового синего (моль/м³); A – площадь рабочего электрода (м²); n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции; F – постоянная Фарадея (Кл/моль), v – скорость развертки потенциала (В/с), D – коэффициент диффузии (м²/с), R – универсальная газовая постоянная (Дж/моль·К), T – температура (К) [14], был рассчитан коэффициент диффузии красителя. Значение коэффициента диффузии ТС в среде глицинового буферного раствора составило $0,81 \times 10^{-9}$ см²/с, что сопоставимо с оценочными значениями коэффициента диффузии ТС полученными по данным расчетов на основе приближения Стокса-Эйнштейна приведенными в литературе ($1,42 \times 10^{-9}$ м²/с) [15]. Интересно, что расчеты коэффициента диффузии на основании вольтамперограмм ЦВА для нейтральной среды дают значения $0,67 \times 10^{-9}$ м²/с.

В среде альгинат-желатинового геля значение коэффициента диффузии, вычисленное на основе анализа кривых ЦВА в начальный момент времени составило $0,03 \times 10^{-9}$ м²/с. Это позволяет говорить о существенных диффузионных ограничениях, формируемых гелем.

Внесение пепсина приводит к существенному повышению коэффициента диффузии ($0,1 \times 10^{-9}$ м²/с), который, впрочем, не достигает значений, соответствующих буферному раствору. Очевидно, что субстратом пепсина в комбинированном гидрогеле «альгинат-желатин» является белок, а альгинатная часть недоступная протеолиту способствует частичному сохранению диффузионных ограничений. К концу эксперимента (около 40 мин.) электрохимическое поведение толудинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле с соотношением компонентов 1:3 в присутствии пепсина характеризуется значением разности потенциалов пиков окисления и восстановления $\Delta E = 120,3$ мВ, а также соотношением пиковых токов: $I_p^{ox}/I_p^{red} = 1,08$ при $I_p^{red} = 8,99$ мкА и $I_p^{ox} = 9,70$ мкА, что приближает систему к обратимому электрохимическому поведению. Повышение относительного содержания альгината в гидрогеле приводит к замедлению роста токов восстановления во времени при моделировании пепсинового протеолиза на электроде.

Варьируя параметры электрохимической модели (количественный состав геля, концентрацию фермента и/или красителя) можно симитировать *in electrode* диффузию в различных гидрогелевых средах при различных значениях pH, используя в качестве электроактивного компонента модели толудиновый синий. Анализ данных циклической вольтамперометрии позволяет провести расчеты эффективного коэффициента диффузии, отражающего подвижность молекул красителя при изменении гидрогеля в ходе протеолиза.

Список литературы / References:

1. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Kuzikov A.V., Agafonova L.E., Archakov A.I. Electrochemical methods in biomedical studies. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2015, vol. 9, no. 3, pp. 228-243.
2. Черенков И.А. Раевских К.С., Сергеев В.Г., Кривилев М.Д. Моделирование протеазной активности с использованием электрохимического интерфейса. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 2, С. 422–426. [Cherenkov I.A., Raevskich K.S., Sergeev V.G. Krivilyov M. D. Modeling protease activity using the electrochemical interface. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 422-426. (In Russ.)]
3. Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochim. Acta, Elsevier*, 2012, vol. 76, pp. 43-47.
4. Fonseca K.B., Bidarra S.J., Oliveira M.J., Granja P.L., Barrias C.C. Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments. *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2011, vol. 7, no. 4, pp. 1674-1682.
5. Черенков И.А., Кропачева Т.Н., Перевозчиков Е.А., Сергеев В.Г. Электрохимическая оценка метаболической активности клеток родококков, иммобилизованных на планарном графитовом электроде. *Технологии живых систем*, 2015, т. 12, № 2, с. 12-19. [Cherenkov I.A., Kropacheva T.N., Perevozchikov E.A., Sergeev V.G. Electrochemical assessment of metabolic activity of rhodococcal cells immobilized on planar graphite electrode. *Tekhnologii zhivyyh sistem*, 2015, vol. 12, no. 2, pp. 12-19. (In Russ.)]
6. Trevors J.T., Pollack G.H. Hypothesis: The origin of life in a hydrogel environment. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005. vol. 89, no. 1. pp. 1-8.
7. Mishra S., Scarano F.J., Calvert P. Entrapment of *Saccharomyces cerevisiae* and 3T3 fibroblast cells into blue light cured hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2012, vol. 100 A, no. 10, pp. 2829-2838.
8. González-Fernández E., Avlonitis N., Murray A. F., Mount A.R., Bradley M. Methylene blue not ferrocene: Optimal reporters for electrochemical detection of protease activity. *Biosens. Bioelectron. Elsevier*, 2016, vol. 84, pp. 82-88.
9. Deng D., Hao Y., Yang S., Han Q., Liu L., Xiang Y., Tu F., Xia N. A signal-on electrochemical biosensor for evaluation of caspase-3 activity and cell apoptosis by the generation of molecular electrocatalysts on graphene electrode surface for water oxidation. *Sensors Actuators, B Chem. Elsevier*, 2019, vol. 286, pp. 415-420.
10. Allavena P., Garlanda C., Borrello M. G., Sica A., Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 3-10.
11. Сергеев В.Г., Сергеева Т.Н., Чучков В.М. Клеточные механизмы хронического нейровоспаления. *Морфологические ведомости*, 2014, № 4, с. 31-36. [Sergeyeva T.N., Sergeyev V.G., Chyuchkov V.M. Cell

mechanisms of chronic neuroinflammation. *Morfologicheskie vedomosti*, 2014, no. 4, pp. 31-36. (In Russ.)]

12. Oda K., Luo Y., Yoshihara A., Ishido, Y., Sekihata K., Usukura K., Sue M., Hiroi N., Hirose T., Suzuki K. Follicular thyroglobulin induces cathepsin H expression and activity in thyrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Elsevier*, 2017, vol. 483, no. 1, pp. 541-546.

13. Dunn J.T., Dunn D. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*, 2001, vol. 11, no. 5, pp. 407-414.

14. Электроаналитические методы, ред. Шольц Ф. М.: Бином «Лаборатория знаний», 2010, 326 с. [*Electroanalytical methods*, ed. Scholz F. M.: Binom "Laboratoriya znaniy", 2010, 326 p. (In Russ.)]

15. Goudie M.J. et al. Investigation of Diffusion Characteristics through Microfluidic Channels for Passive Drug Delivery Applications. *J. Drug Deliv.*, 2016, vol. 2016, pp. 1-9.

DIFFUSION OF TOLUIDINE BLUE IN ALGINATE-GELATINE HYDROGEL UNDER THE INFLUENCE OF PEPSIN

Cherenkov I.A., Berezina L.S., Krivilyov M. D., Sergeyev V.G.

Udmurt State University

Universitetskaya str., 1, Izhevsk, 426034, Russia; e-mail: ivch75@yandex.ru

Abstract. The research is related to electrochemical processes in hydrogel media. An electrochemical model of electroactive phenothiazine dye toluidine blue (TB) diffusion in the medium of a combined alginate-gelatin gel during pepsin proteolysis was studied. The data of cyclic voltammetry (CVA) of the dye in an acidic medium are presented. The TB diffusion coefficient was calculated. It was shown, the curves of cyclic voltammetry had qualitative and quantitative changes compared to data in neutral medium. The dye diffusion in hydrogels with various compositions was studied using the CVA method. Calculations of the TB diffusion coefficient in gel media with different alginate/gelatin ratios were performed. The influence of the hydrogel composition on the character of volt-ampere curves that characterize the redox transformations of an electroactive label was elucidated. The electrochemical characteristics of toluidine blue in an alginate-gelatin hydrogel with a 1:3 component ratio in the presence of pepsin had the value of the potential difference of the oxidation and reduction peaks as $\Delta E = 120,3$ mV, as well as the ratio of peak currents: $I_{p^{ox}}/I_{p^{red}} = 1,08$ at $I_{p^{red}} = 8,99$ μA and $I_{p^{ox}} = 9,70$ μA . The ratio shows that the system is close to reversible electrochemical behavior. The addition of pepsin leads to an acceleration of dye diffusion. It is quantified in a dynamic of current values and an increase in the value of the effective diffusion coefficient. The model can be used to simulate some elements of inflammatory reactions in electrode, to study the quality of enzyme preparations, to evaluate the diffusion properties of various gel-forming agents and their resistance to proteolysis.

Key words: toluidine blue, pepsin, gelatin, alginate, cyclic voltammetry.

О ВЛИЯНИИ НАПИТКОВ И ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗУБНОЙ ЭМАЛИ

Муслов С.А.¹, Бабайцева Л.А.², Хасанов Ф.К.¹

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

г. Москва, РФ; e-mail: muslov@mail.ru

² Стоматологическая поликлиника №61 Департамента здравоохранения г. Москвы

г. Москва, РФ

Поступила в редакцию: 14.07.20

Аннотация. За последние 10 лет продажи фруктовых соков и газированных напитков выросли на 55% и по оценкам будут расти примерно на 2-3% в год. Ряд кислых фруктовых соков и напитков, которые являются частью повседневного рациона питания, являются причинами разрушения структуры зубов и снижения показателей упругости и твердости их поверхности. В данной работе выполнен обзор литературных данных по влиянию среды полости рта и напитков, а также средств гигиены на основные механические свойства эмали зубов (модуль упругости, твердость и шероховатость).

Ключевые слова: продукты, напитки, механические свойства, модуль Юнга, твердость, шероховатость, эрозия, эмаль зуба.

Из всей совокупности показателей механических свойств, характеризующих сопротивление материалов воздействующей на них упругопластической нагрузке, упругие модули и твердость одни из самых чувствительных к изменению структуры вещества. Их изучение всегда вызывает повышенный интерес у исследователей и практикующих врачей-стоматологов. Как известно модуль упругости – общее название нескольких физических величин, отражающих способность твердых тел упруго деформироваться под действием внешних сил. Наиболее распространен и является основным модуль Юнга (соответствующий деформации растяжения-сжатия). Часто модуль Юнга называют просто модулем упругости [4]. Твердость – это сопротивление твердого тела упругой деформации, пластической деформации и разрушению в поверхностном слое при силовых воздействиях на него и функционально крайне важный параметр механических характеристик зубной эмали. Оба показателя измеряются в Па=Н/м², однако имеются существенные различия между этими двумя понятиями. Если при исследовании упругих свойств материал деформируется только упруго, то при тестировании на твердость в процессе увеличения нагрузки образец проходит три стадии: упругую деформацию, пластическую деформацию и разрушение. Таким образом, определение механических свойств по твердости содержит дополнительную информацию, а физическая теория твердости определяется зависимостями, связывающими её с характеристиками упругости, пластичности и разрушения. Микротвердостью называют твердость отдельных участков микроструктуры материала, фаз и структурных составляющих (1 мкм=10⁻⁶ м). Нанотвердость – твердость наноразмерных объектов (1 нм=10⁻⁹ м). Как известно, резистентность зубов определяется различными свойствами эмали, одним из которых является твердость. В свою очередь в возникновении кариозного процесса немаловажную роль отводится резистентности эмали зуба [3].

В [21] Lussi A. et al., 1995 в своей статье, опубликованной в журнале “Caries Research”, сообщили, что яблочный сок вызывает наибольшее значительное снижение ($p<0,05$) микротвердости эмали, после него следовали безалкогольные напитки Schweppes, Orangina и Grapefruit. Наименьшее снижение поверхностной микротвердости, которое было статистически значимым, было вызвано применением Fendant и Isostar orange. Среднее абсолютное отклонение рассчитанной эффективной эрозии составило 7,1%, оно варьировалось от 14,6% (яблочный сок) до 1,6% (Fendant). Исследовали щечные поверхности 84 премоляров без кариеса, залитых смолой и отполированных, при этом 200 микрометров поверхности эмали были удалены. Образцы погружались на 20 минут в напитки. Микротвердость поверхности измеряли до и после погружения.

Целью исследования [22] Lussi A. et al., 2000 было сравнение эрозийного потенциала различных напитков и пищевых продуктов. Шестидесят временных и 60 постоянных зубов человека были погружены на 3 мин в исследуемые растворы (5 зубов на группу). Микротвердость поверхности эмали зубов измеряли до и после воздействия. Базовая поверхностная микротвердость была ниже для временных зубов, чем для постоянных. Как во временных, так и в постоянных зубах Sprite продемонстрировал наибольшее снижение микротвердости поверхности, тогда как йогурт показал увеличение микротвердости поверхности временных зубов. Общее снижение составило 27,2 +/- 17,5 KHN (среднее +/- SD) для временных и 25,9 +/- 15,6 KHN для постоянных зубов (KHN – единица измерения твердости по Кнупу). Сравнение восприимчивости к эрозии в этой модели *in vitro* показало, что временные зубы не были более подвержены эрозии по сравнению с постоянными зубами.

Авторы Zero DT et al., 1996 [31] среди других уделяют диетологическим факторам при анализе эрозии зубов первостепенное внимание, при этом общий уровень кислоты пищевых веществ авторы считают не менее важным, чем их pH, поскольку он определяет фактический уровень H⁺, доступный для взаимодействия с веществом поверхности зуба. Другие составляющие пищевых продуктов и напитков также оказывают модифицирующее действие на поверхность, включая кальций, фосфаты и фториды, также имеет значение тип кислоты.

Edwards M. и соавт., 1999 [14] обнаружили, что фруктовые газированные напитки имеют больший эрозионный потенциал, чем другие газированные напитки, а ароматизированные воды обладают таким же эрозионным потенциалом, что и фруктовые газированные напитки. В рамках исследования были протестированы следующие группы напитков: чистые фруктовые соки, газированные напитки не на фруктовой основе, газированные напитки на фруктовой основе, ароматизированные родниковые воды и обычные газированные минеральные воды.

Когда к Coca-Cola® добавляли лактат кальция (донор кальция), у крыс значительно уменьшалась эрозия зубов по сравнению с неизмененным Coca-Cola® после 5 недель контакта с ней (Beiraghi S. et al., 1989 [10]). Усилия по защите зубов от эрозивных веществ включали в себя снижение потребления кислой пищи и газированных напитков (Dodds M. et al., 1997 [13], Maupome G. et al., 1998 [25]). При этом в [23] отмечали, что кислотный эффект газированных напитков в основном обусловлен фосфорной кислотой.

Температура и время воздействия влияют на механические свойства эмали человека (West NX et al., 2000 [29], Eisenburger M et al., 2003 [15], Barbour ME et al., 2006 [9]). В [15] подчеркнуто, что эрозия и размягчение эмали основаны на химических процессах, на которые могут влиять многие факторы, включая температуру и скорость кислотного потока. Выявлена сильная зависимость эрозии от потока жидкости. Глубина эрозии значительно увеличивалась при температуре кислоты с 11,0 микрон при 4 градусах С до 35,8 микрон при 50 градусах. Результаты [28] также показали, что повышение температуры, концентрации и времени воздействия увеличивало эрозию дентина и эмали. Образцы помещали в лимонную, молочную, яблочную или фосфорную кислоты. Авторы [9] указывают, что исследования эрозивного потенциала безалкогольных напитков обычно проводятся при комнатной температуре или температуре тела, но напитки чаще подают охлажденными, со льдом или горячими. Поскольку скорость химических реакций обычно увеличивается с ростом температуры, предсказывалось, что эрозия более сильная при высоких температурах и уменьшается при низких температурах. Атомно-силовая микроскопия, наноиндентирование и бесконтактная оптическая профилометрия были использованы для оценки изменений наномеханических свойств эмали через 5 минут и потери эрозионного материала через 30 минут при воздействии двух разных негазированных безалкогольных напитков при 4, 25, 50 и 75 °С. Для одного напитка (сокосодержащий напиток Robinson's Original Juice Drink) была установлена статистически значимая разница между наномеханическими свойствами и глубиной эрозии при всех температурах, причем размягчение и эрозия увеличивались с ростом температуры. Что касается другого напитка (сока Ribena ToothKind Juice Drink), то произошло небольшое размягчение и практически не было потери материала, а температура не оказала статистически значимого влияния на эрозию. Наблюдалась сильная линейная корреляция ($R^2 = 0,94$) между наномеханическими свойствами и потерей материала. Разницу между напитками можно объяснить их составом. Для эрозионного напитка потеря материала увеличилась, а нанотвердость уменьшилась, приблизительно линейно с температурой.

Продукты из citrusовых широко распространены в современных диетах. Citrusовые содержатся в ежедневном рационе многих людей, среди них наиболее распространены апельсин, мандарин, лимон, грейпфрут, лайм и др. Большая часть экспериментальных работ по определению влияния citrusовых на эмаль сосредоточена на напитках. Исследования показали, что существует сильная корреляция между употреблением в пищу citrusовых конфет, citrusовых безалкогольных напитков и деградацией эмали.

В следующем, тщательно выполненном исследовании (Machado C. et al., 2008 [23]) оценивали модуль упругости, нанотвердость, шероховатость поверхности эмали человека после контакта с citrusовыми напитками. Образцы эмали были распределены на 3 группы в зависимости от типа используемого напитка: газированный напиток (Sprite®), апельсиновый сок и водопроводная вода (контроль). Шероховатость поверхности оценивали с помощью профилометра, а нанотвердость и модуль упругости регистрировали с использованием наноиндентора. Величину pH напитков измеряли до и после контакта с лимонной кислотой в течение 5 недель. Применяли специальный статистический тест. Средние значения и стандартные отклонения показателей механических свойств эмали (SD) оказались следующими.

Газированный напиток: модуль упругости снизился с 111,6 (14,5) до 62,2 (10,3) ГПа, нанотвердость снизилась с 4,62 (0,67) до 1,28 (0,46) ГПа, шероховатость увеличилась с 5,30 (2,39) до 6,86 (2,56) мкм и pH изменился с 2,69 (0,35) до 2,29 (0,24).

Апельсиновый сок: модуль упругости изменился с 115,15 (12,94) до 92,11 ГПа (13,83), нанотвердость с 5,54 (1,48) до 3,18 ГПа (0,64), шероховатость с 5,26 (2,27) до 6,73 (2,25) мкм и pH с 3,46 (0,20) до 3,03 (0,14).

Водопроводная вода (контроль): модуль упругости изменился с 117,87 (22,3) до 107,91 (20,05) ГПа, нанотвердость с 4,35 (1,66) до 4,28 (0,93) ГПа, шероховатость с 5,76 (3,11) до 6,11 (2,65) мкм и pH с 7,97 (0,28) до 8,11 (0,21) (табл. 1-3).

Таким образом, авторами установлено, что воздействие безалкогольных напитков вызывает значительное снижение модуля упругости и нанотвердости. Апельсиновый сок, что удивительно, оказал меньшее влияние на твердость, модуль упругости и шероховатость эмали, чем газированный напиток.

Таблица 1. Модуль Юнга эмали до и после контакта с напитками

	Газированный напиток		Апельсиновый сок		Водопроводная вода (контроль)	
	До	После	До	До	После	До
Mean	111,6	62,19	115,15	92,11	117,87	107,91
(SD) (ГПа)*	(14,46)	(10,33)	(12,94)	(13,83)	(22,30)	(20,05)
	А		В		В	

* $p < 0,0001$, Mean – среднее, SD – стандартное отклонение, А-В – группы в методе Тьюки-Крамера множественного сравнения.

Таблица 2. Нанотвердость эмали до и после контакта с напитками

	Газированный напиток		Апельсиновый сок		Водопроводная вода (контроль)	
	До	После	До	После	До	После
Mean	4,62	1,28	5,54	3,18	4,35	4,28
(SD) (ГПа)*	(0,67)	(0,46)	(1,48)	(0,64)	(1,66)	(0,93)
	А		А		В	

* $p < 0,0001$

Таблица 3. Шероховатость до и после контакта с напитками

	Газированный напиток		Апельсиновый сок		Водопроводная вода (контроль)	
	До	После	До	После	До	После
Mean	5,30	6,86	5,26	6,73	5,76	6,11
(SD) (мкм)*	(2,39)	(2,56)	(2,27)	(2,25)	(3,11)	(2,65)
	А		А		А	

* $p < 0,49$

Таблица 4. Значения pH напитков до и после погружения образцов эмали

	Газированный напиток		Апельсиновый сок		Водопроводная вода (контроль)	
	До	После	До	После	До	После
Mean	2,69	2,29	3,46	3,03	7,97	8,11
(SD)*	(0,35)	(0,24)	(0,20)	(0,14)	(0,28)	(0,21)
	А		А		В	

* $p < 0,0001$

Проведенные исследования позволили авторам сделать следующие выводы:

1. Нанотвердость зубной эмали значительно уменьшилась примерно до 1/3 и 1/2 от его первоначального значения после контакта с газированным безалкогольным напитком и апельсиновым соком, соответственно.
2. Модуль упругости эмали уменьшился больше в газированном напитке, чем в апельсиновом соке.
3. Воздействие безалкогольного напитка или апельсинового сока в течение 5 недель существенно не повлияло на целостность поверхности эмали при профилометрическом измерении шероховатости эмали.
4. Уровень pH безалкогольного напитка и сока упал от низкого до очень низкого (кислотные значения) при изменении температуры от 5° С до 37° С.

Отметим также, что значения модуля Юнга, нанотвердости и шероховатости зубной эмали, полученные в данной работе хорошо согласуются с данными, сообщенными авторами обзора в [1, 2].

Сообщалось и о других подобных исследованиях, например, выполненных в (Haghgou HR et al., 2016 [18]). Авторы утверждают, что потребление газированных напитков является одним из этиологических факторов, вызывающих эрозию зубов. Целью их исследования было сравнение изменений микротвердости постоянных и временных зубов после погружения в два типа газированных напитков Lemon Delster и Coca-Cola (рис. 1). Как известно, среди ингредиентов Coca-Cola присутствуют: aqua carbonated (газированная вода), сахар, ароматизаторы, кофеин, красители, кислоты (цикламовая кислота и её натриевые, калиевые и кальциевые соли – E952, ортофосфорная H_3PO_4 – E338, лимонная – E330, бензойная – E210) и другое. Исследование было проведено на 30 здоровых постоянных молярах и 30 здоровых временных клыках. Каждая группа временных и постоянных зубов была разделена на три группы по 10 зубов. Зубы погружали в 40 мл каждого из двух напитков и воду на 5 минут. Одна подгруппа была погружена в воду (в качестве контроля). Следующая была погружена в Lemon Delster, а последняя подгруппа была погружена в Coca-Cola. Микротвердость эмали измеряли по методу Виккерса до и после погружения. Данные были проанализированы с помощью парного t-критерия и одностороннего дисперсионного анализа. Снижение микротвердости в временных зубах было значительным как в группах Lemon Delster, так и в группе Coca-Cola ($p < 0,05$). Это снижение также было статистически значимым в постоянных зубах ($p < 0,05$). Сравнение изменений эмали в временных зубах с таковыми в постоянных зубах после погружения в оба напитка показало большее снижение микротвердости в временных зубах в обеих экспериментальных группах. По результатам исследования авторы сделали вывод, что Coca-Cola и Lemon Delster вызывали значительное снижение микротвердости зубной эмали. Это уменьшение было больше во временных зубах, чем в постоянных зубах и было также больше после погружения в Coca-Cola, чем после погружения в Lemon Delster.

West et al. измеряли влияние кислот и pH на эрозию дентина и эмали и показали, что лимонная кислота с более высоким pH продемонстрировала более низкую эрозионную способность, чем фосфорная кислота с более низким pH (West NX et al., 2001 [30]). Потерю ткани рассчитывали по профилометрии. При этом авторы указывают, что лимонная и фосфорная кислоты являются двумя основными пищевыми кислотами, присутствующими в кислых безалкогольных напитках. Эти факторы могут быть рассмотрены с целью снижения эрозивности кислых безалкогольных напитков.

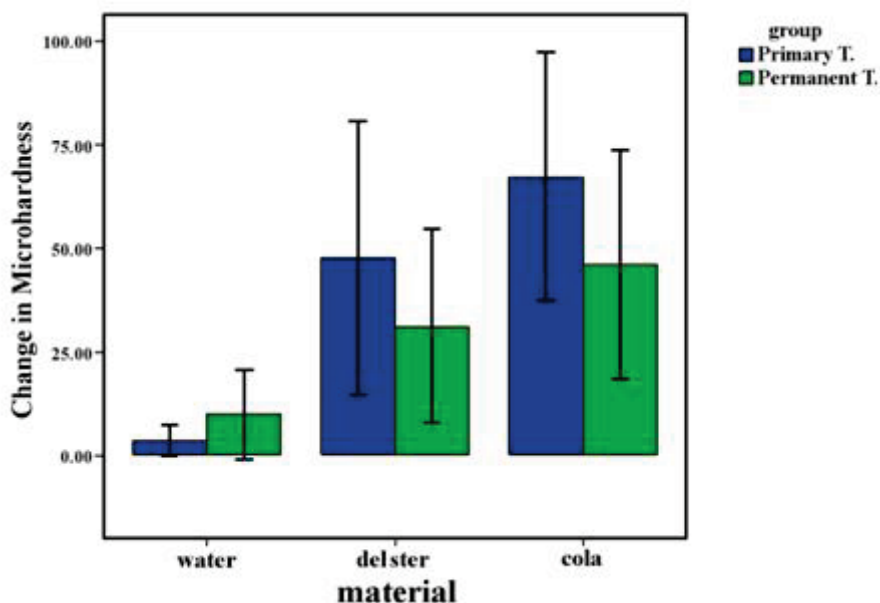


Рисунок 1. Изменение микротвердости эмали после погружения временных и постоянных зубов в напитки и воду (контроль) $\pm$ SD. Primary T. и Permanent T. – временные и постоянные зубы, соответственно (Haghgou HR et al., 2016 [18])

Тем временем Lippert et al., 2004 [20] установили, что эффект смягчения эмали лимонада и колы, которые содержат фосфорную кислоту, сильнее, чем влияние фруктовых соков, содержащих лимонную кислоту. Эти результаты находятся в соответствии с результатами (Haghgou HR et al., 2016 [18]).

Fallahinejad и соавт. заявили, что кислые напитки вызывают у зубов большую потерю кальция, чем стандартные и контрольные растворы. Они сравнивали 4 вида напитков с 4 стандартными растворами с одной и той же кислотой и pH как у напитков. Это указывало на то, что газы и другие ингредиенты в напитках, такие как сахар, могут увеличить эффект эрозии в напитках больше, чем простая кислота (Fallahinejad G. et al., 2007 [16]). В этом исследовании для измерения количества выхода кальция использовались спектрометрия и фотометрия.

Ganss C. et al. и Schlueter N. et al. использовали профилометрический метод для исследования влияния кислоты на зубную ткань путем измерения шероховатости алмазным зондом. Контакт с кислотными растворами приводил к снижению в микротвердости эмали и потере поверхностных тканей (Ganss C. et al. 2005 [17], Schlueter N. et al., 2011 [27]).

Meurman JH et al., 1991 в тестах *in vitro* [26] обнаружили, что нешлифованная эмаль менее подвержена эрозии в Coca-Cola, содержащей фосфорную кислоту (pH 2,6), и спортивных напитках, содержащих лимонную или яблочную кислоту (pH 2,8 и 3,4, соответственно) в течение 15-180 мин., чем полированная алмазной пастой эмаль. Эрозию эмали человека и бычьей эмали исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа.

Патологическому влиянию Coca-Cola и воздействию искусственной слюны на твердость эмали зубов были посвящены работы Devlin H. et al. (2006) [12] и Tantbirojn D. et al. (2008) [28]. Цель исследования Devlin H. et al. (2006) состояла в том, чтобы определить скорость изменения твердости эмали индентированием постоянных зубов, подвергшихся воздействию Coca-Cola. В следующем эксперименте была проверена способность искусственной слюны реминерализовать эмаль, обработанную Coca-Cola. Десять образцов эмали были отобраны случайным образом для обработки Coca-Cola (экспериментальные группы) и семь – водой (контрольная группа). Жидкости наносили в течение 1, 2, 3 часов и в течение ночи (15 часов), смывали несколькими каплями воды и после проверяли твердость индентированием влажной эмали. При обработке Coca-Cola средняя твердость эмали составила 92,6% (SD = 7,9) от исходной твердости через 1 час, 93,25% (SD = 10,15) через 2 часа, 85,7% (SD = 12,03) через 3 часа и 80,3 % через 15 часов. Средняя твердость при индентировании контрольных образцов, обработанных водой, составила 108,7% (SD = 16,09) от исходной твердости через 1 час, 99,09% (SD = 18,98) через 2 часа, 98,97% (SD = 11,24) через 3 часа и 98,42% (SD = 22,78) через 15 часов. В отдельном эксперименте твердость 9 образцов эмали тестировалась, как описано ранее, до и после обработки Coca-Cola в течение ночи и снова после нанесения искусственной слюны в течение 3 минут. Coca-Cola снизила среднюю твердость эмали на зубах при индентировании, но она была частично восстановлена искусственной слюной (Salivart) и увеличилась на 18% по сравнению с твердостью деминерализованной эмали.

Tantbirojn D. et al. (2008) измерениями твердости эмали по Кнупу *in vitro* установили (ANOVA, $p < 0,05$), что нанесение пасты, содержащей аморфный фосфат кальция (CPP-ACP), с непрерывным пополнением слюнообразного раствора в течение 48 ч значительно отверждало эмаль, смягченную напитком Coca-Cola. Растворы, заменяющие слюну, представляли собой: слюноподобный раствор (SLS) с 1 ppm фторида, SLS без фтора и биотин для полоскания рта. При этом было выявлено, что биотин для полоскания рта смягчает эмалевую поверхность после 48 ч контакта.

Способность безалкогольного напитка или сока разрушать зубную эмаль зависит не только от pH напитка, но и от его буферного эффекта [19]. Поскольку последний является способностью напитка противостоять изменению pH, он может влиять на действие фактического pH. Целью исследования было сравнение pH и буферных свойств различных безалкогольных напитков с их эрозионным эффектом. В 18 безалкогольных напитках, минеральных водах и соках, доступных на датском рынке, были определены pH и концентрации кальция, фосфата и фтора. Буферный эффект определяли титрованием NaOH. Человеческие зубы ($n = 54$), покрытые лаком для ногтей, за исключением окон размером 3x4 мм, подвергались воздействию 1,5 литров напитка в течение 7 дней или 24 часов при постоянном перемешивании. Глубина эрозии оценивалась в продольных разрезах. Было установлено, что глубина сильно варьируется от 3 мм, вымываемых большинством кислыми напитками и свежим апельсиновым соком, до незначительно пораженных поверхностей большинством минеральных вод. Растворение эмали увеличивалось логарифмически обратно пропорционально pH. Апельсиновый сок, pH 4,0, с добавлением 40 ммоль/л кальция и 30 ммоль/л фосфата не разрушал эмаль, поскольку кальций и фосфат насыщали напиток по отношению к апатиту. Как правило, чем ниже pH, тем больше NaOH необходимо для доведения pH до нейтрального. В частности, буферный эффект сока был высоким. Для всех напитков не наблюдалось влияния низких концентраций фтора.

Заслуживают внимания исследования, выполненные Chen X et al. в 2013 г. [11]. Авторы, используя отбеливающие зубы вещества в пробирке и кислые напитки, провели сравнительное исследование изменений морфологии поверхности эмали, содержания Ca/P и величины твердости. Отбеливающие зубы материалы, колу и апельсиновый сок использовали для замачивания зубов в искусственной слюне *in vitro*. Физиологический солевой раствор использовали в качестве контрольного лечения. Морфологию четырех групп наблюдали под сканирующим электронным микроскопом (SEM) сразу после того, как зубы были пропитаны в течение 7 и 14 дней. Были проанализированы изменения содержания Ca/P и микротвердости. Эмалевые поверхности зубов в трех испытательных группах были деминерализованы. Соотношение Ca/P и средняя микротвердость были значительно ниже, чем у контрольной группы сразу после замачивания зубов ($p < 0,05$). Соотношение Ca/P и

микротвердость постепенно увеличивались через 7 дней. Не наблюдалось значительного различия между контрольной группой и испытуемыми группами через 14 дней ($p > 0,05$). В результате были сделаны следующие выводы. Отбеливающие агенты вызвали временную деминерализацию человеческой эмали, но эти агенты могли вызывать реминерализацию и восстановление эмали с течением времени. Деминерализация, вызванная отбеливанием, охватывает относительно нормальный диапазон по сравнению с кислыми напитками и ежедневным употреблением алкоголя.

Худанов Б.О. с соавт. [7] определили частоту потребления безалкогольных напитков у школьников и оценили эрозивный потенциал безалкогольных напитков гравиметрическим методом. Исследуемые напитки имели pH от 2,50 до 4,56. Наибольшая потеря массы была выявлена у образцов, хранившихся в напитках со значением $pH < 3,5$ ($p < 0,01$). Риск развития эрозии зубов повышался вследствие привычки детей пить не через трубочку (70,0%) и удерживать напитки во рту (27,1%). Установлено, что высокая частота и способы употребления безалкогольных напитков повышают риск развития эрозии твердых тканей зубов у школьников.

В связи с тем, что главным и наиболее изученным фактором, оказывающим влияние на пораженность зубов кариесом, является фтор, особенно его содержание в воде, целью ряда исследований было изучение микротвердости эмали и дентина зубов у лиц, проживающих в различных климатогеографических зонах, определение взаимосвязи микротвердости с содержанием фтора в источниках питьевой воды и пораженностью населения кариесом. Исследованию в [3] были подвергнуты зубы с интактной эмалью, удаленные по ортопедическим и ортодонтическим показаниям у лиц 35-44 лет из различных климатогеографических зон Азербайджана: Зыря (низменный район, очаг эндемического флюороза, где концентрация фтора в источниках питьевой воды составляет 1,8 мг/л), Шеки (предгорье, очаг эндемического зоба; концентрация фтора 0,05 мг/л), Кедабека (горный район; концентрация фтора 0,32 мг/л) и Кюрдамира (низменный район; концентрация фтора 0,2-0,41 мг/л). При этом авторы отмечали, что в литературе не обнаружили данных о микротвердости эмали и дентина зубов у лиц, проживающих в различных климато-географических зонах.

Наиболее высокие показатели микротвердости эмали и дентина отмечены в Зыря, где концентрация фтора в источниках питьевой воды самая высокая. При этом наибольшие показатели микротвердости отмечены в поверхностных слоях эмали ($391,8 \pm 5,7 - 432,9 \pm 6,3$ кг/мм²). По мере приближения к эмалево-дентинному соединению показатели микротвердости уменьшаются. Так, в средних слоях эмали она составила $367,6 \pm 6,1 - 417,8 \pm 5,9$ кг/мм², у эмалево-дентинного соединения – $348,2 \pm 6,5 - 376,4 \pm 3,7$ кг/мм² ($p < 0,001$). Из всех обследуемых регионов наиболее низкие показатели микротвердости эмали и дентина отмечены в Шеки с наименьшей концентрацией фтора в питьевой воде и в очаге эндемического зоба.

В результате проведенных исследований установлена прямая зависимость между концентрацией фтора и ряда других микроэлементов (меди, цинка, кобальта и др.) в источниках питьевой воды и микротвердостью эмали и дентина. Также выявлено благотворное влияние на микротвердость эмали и дентина ряда климатогеографических факторов, характерных для горной местности. Определена обратная зависимость между показателями интенсивности кариеса и микротвердости. Полученные данные могут служить показателем функциональной устойчивости твердых тканей зубов.

Действие некоторых кислых продуктов (лимон, яблоко, ацидин-пепсин) изучал С.М. Ремизов [5]. Ацидин-пепсин назначается при заболеваниях, которые сопровождаются снижением уровня соляной кислоты в желудке. Лабораторно установлены границы изменений в эмали в зависимости от продукта и продолжительности его воздействия. Установлено, что сок лимона, кислого яблока и раствор ацидин-пепсина вызывают понижение величины микротвердости эмали здоровых зубов человека. Наибольшее действие оказывает лимон, наименьшее – яблоко. Действие этих продуктов питания, а также раствора ацидин-пепсина, на эмаль в течение 3-х минут сопровождается понижением величины микротвердости по сравнению с интактной эмалью на 40, 21,5 и 26,5% соответственно. Данные статистически достоверны. Увеличение времени действия этих веществ на эмаль приводит к дальнейшему понижению ее микротвердости: через 20 минут твердость была зафиксированной ниже контрольной на 67, 39 и 49%, соответственно. Описанные изменения усугубляются последующим действием зубной щетки. Размягченный меловидноизмененный слой эмали (толщина 2-5 мкм) исчезает через 5-10 минут чистки с пастой “Жемчуг” (в настоящее время отечественной промышленностью выпускаются зубные пасты “Новый жемчуг”, АО Невская косметика и “Жемчуг московский”, АО Свобода).

Помимо влияния напитков и питьевой воды исследовали сравнительное действие на зубную эмаль средств гигиены. С.М. Ремизов и Л.Ю. Пружанский [6] изучали шероховатость эмали на предмет абразивности гигиенических средств при трении зубной щеткой с тем или иным средством (абразивность – способность истирать какую-либо поверхность). Исследовали 15 гигиенических средств (13 отечественных и 2 импортных), щетка прижималась к образцу зуба с усилием 300 гс. Определяли среднее арифметическое отклонения профиля поверхности от его средней линии, известное как Ra. Испытанные гигиенические средства располагаются в порядке возрастающей способности следующим образом: пасты “Жемчуг”, “Чебурашка”, “Семейная”, “Мятная”, “Лесная”, “БАМ”, “Ягодка”, зубные порошки “Детский”, “Жемчуг”, “Мятный”, “Особый”, пасты “Апельсиновая”, “Олимп”, “Поморин”, “Колинос”. Паста “Колинос” абразивнее других гигиенических средств в 3-6 раз. Шероховатость эмали за период испытаний 270 мин с разными средствами возрастала в 5-10 раз, а при использовании пасты Колинос – в 32 раза по сравнению с исходной.

Целью исследования [24] было оценить влияние фторидных, ксилитных, пробиотических и отбеливающих зубных паст на шероховатость и микротвердость эмали постоянных зубов. Сто двадцать зубов были случайным образом разделены на 2 группы, каждая из которых имела 60 образцов. G1: группа, в которой исследовалась

шероховатость эмали ($n = 60$). G2: группа, в которой исследовалась микротвердость эмали ($n = 60$). Затем эти группы были случайным образом разделены на 4 группы между собой ($n=15$). Каждую группу чистили с использованием четырех разных зубных паст в течение 1 недели с помощью зубной щетки с батарейным питанием утром и вечером в течение 2 минут. Твердомер Виккерса использовался для измерения изменений микротвердости, а профилометр – для измерения изменений шероховатости поверхности. Статистически значимых различий не было обнаружено по значениям шероховатости поверхности и микротвердости, измеренным после процесса чистки зубов в группе, в которой использовалась зубная паста Colgate MaxFresh ($p>0,01$). Статистически значимое снижение твердости по Виккерсу наблюдалось в группах, в которых использовали для чистки зубов пасты Ipana White Power Carbonate, Periobiotic Probiotic и гель Xyliwhite Toothpaste ($p<0,01$). Статистически значимое увеличение наблюдалось по значениям шероховатости поверхности в группах, где зубы обрабатывались зубной пастой Ipana White Power Carbonate, гелем с зубной пастой Xyliwhite, пробиотической зубной пастой с пробиотическими пробиотиками ($p<0,01$). По результатам исследований были сделаны следующие выводы: зубная паста Colgate MaxFresh без абразива с фтором не влияет на шероховатость поверхности зубной эмали и ее микротвердость. Абразивные зубные пасты Xyliwhite, Periobiotic и Ipana White Power, содержащие карбонат, приводили к отрицательным изменениям шероховатости поверхности эмали постоянных зубов и микротвердости.

Другими исследователями микротвердость по Кнупу и шероховатость поверхности (Ra) различных реставрационных материалов анализировали в заранее определенные периоды оценки: 24 часа, 7, 30 и 60 дней после изготовления образцов. Было установлено, что микротвердость композитных материалов оставалась стабильной по величине до 1 месяца выдержки в напитках (Coca-Cola, на основе сахарного тростника, кофе и искусственная слюна – контроль), но значительно снижалась на второй месяц (Badra VV et al., 2005 [8]). Шероховатость образцов при этом почти синхронно увеличивалась.

Выводы.

Газированные и фруктовые напитки снижают механические свойства эмали, шероховатость эмали при этом, наоборот, возрастает. Потребление газированных напитков является одним из этиологических факторов, вызывающих эрозию зубов.

Усилия по защите зубов от эрозивных веществ включают в себя снижение потребления кислой пищи, цитрусовых и газированных напитков (в особенности Coca-Cola), а также добавление в них лактата кальция. После питья соков, особенно кислых, рекомендуется полоскать рот. Кроме того, кислые фруктовые соки следует пить через соломинку, чтобы уберечь зубную эмаль от повреждения.

Средняя твердость эмали зубов при индентировании, сниженная обработкой Coca-Cola, частично восстанавливается искусственной слюной (Salivart).

Нанесение пасты, содержащей аморфный фосфат кальция (CPP-ACP), с непрерывным пополнением слюнообразного раствора в течение 48 ч значительно отверждает эмаль, смягченную напитком Coca-Cola.

Установлена прямая зависимость между концентрацией фтора и ряда других микроэлементов (меди, цинка, кобальта и др.) в источниках питьевой воды и микротвердостью эмали и дентина. Показатели микротвердости эмали и дентина зубов у лиц, проживающих в различных климатогеографических зонах, отличаются друг от друга и максимальны в районах, где концентрация фтора в источниках питьевой воды наиболее высокая и, наоборот, минимальны в регионах с наименьшей концентрацией фтора в питьевой воде.

Работа выполнена в соответствии с планами НИР кафедр пропедевтики стоматологических заболеваний, нормальной физиологии и медицинской физики МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Список литературы / References:

1. Лебеденко И.Ю., Арутюнов С.Д., Муслов С.А., Усеинов А.С. Нанотвердость и модуль Юнга зубной эмали. *Вестник РУДН, серия Медицина*, 2009, № 4, с. 637-638. [Lebedenko I.Yu., Arutyunov S.D., Muslov S.A., Useinov A.S. Nanotverdst' i modul' Yunga zubnoj emali. *Vestnik RUDN, seriya Medicina*, 2009, no. 4, pp. 637-638. (In Russ.)]
2. Лебеденко И.Ю., Арутюнов С.Д., Муслов С.А., Усеинов А.С. Исследование наномеханических свойств зубной эмали. *Кафедра*, зима 2009-2010, № 32, с. 24-28. [Lebedenko I.Yu., Arutyunov S.D., Muslov S.A., Useinov A.S. Issledovanie nanomekhanicheskikh svoystv zubnoj emali. *Kafedra*, zima 2009-2010, no. 32, pp. 24-28. (In Russ.)]
3. Пашаев Ч.А., Ахмедов Р.М., Халифа-заде Ч.М. Влияние фтора и других биогеохимических факторов на микротвердость эмали и дентина. *Стоматология*, 1990, № 6, с. 10-12. [Pashaev Ch.A., Ahmedov P.M., Halifa-zade Ch.M. Vliyanie ftora i drugih biogeoхимических faktorov na mikrotverdst' emali i dentina. *Stomatologiya*, 1990, no. 6, pp. 10-12. (In Russ.)]
4. Перцов С.С., Стюрева Г.М., Муслов С.А., Синицын А.А., Корнеев А.А., Зайцева Н.В. *Основы биомеханики для стоматологов*. МГМСУ, 2017, 115 с. [Percov S.S., Styureva G.M., Muslov S.A., Sinicyn A.A., Korneev A.A., Zajceva N.V. *Osnovy biomekhaniki dlya stomatologov*. MGMSU, 2017, 115 p. (In Russ.)]
5. Ремизов С.М. Влияние на эмаль зубов человека кислых продуктов. *Основные стоматологические заболевания*, 1981, с. 67-69. [Remizov S.M. Vliyanie na emal' zubov cheloveka kislykh produktov. *Osnovnye stomatologicheskie zabolevaniya*, 1981, pp. 67-69. (In Russ.)]
6. Ремизов С.М., Пружанский Л.Ю. Оценка абразивности средств гигиены полости рта по изменению шероховатости эмали зуба. *Стоматология*, 1983, т. 3, с. 20-23. [Remizov S.M., Pruzhanskij L.Yu. Ocenka

abrazivnosti sredstv gigieny polosti rta po izmeneniyu sherohovatosti emali zuba. *Stomatologiya*, 1983, vol. 3, pp. 20-23. (In Russ.)]

7. Худанов Б.О., Маслак Е.Е., Халилов И.Х., Тураев К.И., Абдурахимова Ф.А. Потребление школьниками безалкогольных напитков и их эрозивный потенциал (по данным гравиметрии *in vitro*). *Стоматология детского возраста и профилактика*, 2019, т. 19 (2), с. 25-29. DOI: 10.33925/1683-3031-2019-19-2-25-29. [Hudanov B.O., Maslak E.E., Halilov I.H., Turaev K.I., Abdurahimova F.A. Potreblenie shkol'nikami bezalkogol'nyh napitkov i ih erozivnyj potencial (po dannym gravimetrii *in vitro*). *Stomatologiya detskogo vozrasta i profilaktika*, 2019, vol. 19 (2), pp. 25-29. (In Russ.)]

8. Badra V.V., Faraoni J.J., Ramos R.P., Palma-Dibb R.G. Influence of different beverages on the microhardness and surface roughness of resin composites. *Oper Dent*, 2005, vol. 30, pp. 213-219.

9. Barbour M.E., Finke M., Parker D.M., Hughes J.A., Allen G.C., Addy M. The relationship between softening and erosion caused by soft drinks at a range of temperatures. *J Dent*, 2006, vol. 34, pp. 207-213.

10. Beiraghi S., Atkins S., Rosen S., Wilson S., Odom J., Beck M. Effect of calcium lactate in erosion and *S. mutans* in rats when added to Coca-Cola. *Pediatr Dent*, 1989, vol. 11, pp. 312-315.

11. Chen X., Chen Z., Lin Y., Shao J., Yin L. Effects of tooth whitening agents and acidic drinks on the surface properties of dental enamel. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2013, vol. 31(5), pp. 530-532.

12. Devlin H., Bassiouny M., Boston D. Hardness of enamel exposed to Coca-Cola® and artificial saliva. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2006, vol. 33, no. 1, pp. 26-30.

13. Dodds M., Peggy P., Rodriguez D. The effect of some Mexican citric acid snacks *on vitro* tooth enamel erosion. *Pediatr. Dent.*, 1997, vol. 19, pp. 339-340.

14. Edwards M., Creanor S.L., Foye R.H., Gilmour W.H. Buffering capacities of soft drinks: the potential influence on dental erosion. *J. Oral Rehabil.*, 1999, vol. 26, pp. 923-927.

15. Eisenburger M., Addy M. Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *J. Oral Rehabil.*, 2003, vol. 30, pp. 1076-1080.

16. Fallahinejad Ghajari M., Nabavi Razavi S. Comparing the effect of Iranian soft drinks with the standard sample; Calcium ion analysis. *J. Tehran. Univ. Med. Sci.*, 2007, vol. 20, pp. 27-32.

17. Ganss C., Lussi A., Klimek J. Comparison of calcium/ phosphorus analysis, longitudinal micro radiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive de-mineralization. *Caries Res.*, 2005, vol. 39, pp. 178-184.

18. Haghighi H.R., Haghighi R., Asdollah F.M. Comparison of the microhardness of primary and permanent teeth after immersion in two types of carbonated beverages. *J. Int. Soc. Prevent Communit Dent.* [serial online], 2016, vol. 6, pp. 344-8.

19. Larsen M.J., Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.*, 1999, vol. 33 (1), pp. 81-87.

20. Lippert F., Parker D.M., Jandt K.D. Susceptibility of deciduous and permanent enamel to dietary acid induced erosion studied with atomic force microscopy nano indentation. *Eur. J. Oral Sci.*, 2004, vol. 112, pp. 61-66.

21. Lussi A., Jaeggi T., Jaeggi-Scharer S. Prediction of the erosive potential of some beverages. *Caries Res*, 1995, vol. 29, pp. 349-354.

22. Lussi A., Kohler N., Zero D., Schaffner M., Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an *in vitro* model. *Eur. J. Oral Sci.*, 2000, vol. 108 (2), pp. 110-114.

23. Machado C. et al. Human Enamel Nanohardness, Elastic Modulus and Surface Integrity after Beverage Contact. *Braz Dent J*, 2008, vol. 19 (1), pp. 68-72.

24. Maden E.A., Altun C., Polat G.G., Basak F. The *In vitro* Evaluation of the effect of xylwhite, probiotic, and the conventional toothpastes on the enamel roughness and microhardness. *Niger J. Clin. Pract.* [serial online], 2018, vol. 21, pp. 306-311.

25. Maupome G., Diez de Bonilla J., Torres-Villasenor G., Andrade-Delgado L.C., Castaño V.M. *In vitro* quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in cola drink. *Caries Res.*, 1998, vol. 32, pp. 148-153.

26. Meurman J.H., Frank R.M. Progression and surface ultrastructure of *in vitro* caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res.*, 1991, vol. 25, pp. 81-87.

27. Schlueter N., Hara A., Shellis R.P., Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.*, 2011, vol. 45, suppl. 1, pp. 13-23.

28. Tantbirojn D., Huang A., Ericson M., Poolthong S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. *Journal of Dentistry*, 2008, vol. 36, no. 1, pp. 74-79.

29. West N.X., Hughes J.A., Addy M. Erosion of dentine and enamel *in vitro* by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J. Oral Rehabil.*, 2000, vol. 27, pp. 875-880.

30. West N.X., Hughes J.A., Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids *in vitro*. *J Oral Rehabil*, 2001, vol. 28, pp. 860-864.

31. Zero D.T. Etiology of dental erosion - extrinsic factors. *Eur. J. Oral Sci.*, 1996, vol. 104, pp. 162-177.

INFLUENCE OF MILK AND DAIRY PRODUCTS ON THE HARDNESS AND ROUGHNESS OF TEETH
ENAMELMuslov S.A.¹, Babaitseva L.A.², Khasanov F.K.¹¹ A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Moscow, Russia; e-mail: muslov@mail.ru² Dental Clinic No. 61 of the Moscow Department of Health
Moscow, Russia

Abstract. Over the past 10 years, sales of fruit juices and carbonated drinks have grown by 55% and are estimated to grow by about 2-3% per year. A number of acidic fruit juices and drinks, which are part of the daily diet, are the causes of the destruction of the tooth structure and a decrease in the elasticity and hardness of their surface. In this paper, a review of published data on the influence of the environment of the oral cavity and drinks on the basic mechanical properties of tooth enamel (elastic modulus, hardness and roughness) is performed.

Key words: products, drinks, mechanical properties, Young's modulus, hardness, roughness, erosion, tooth enamel.

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМАХ У ДЕТЕЙ

Климкович Н.Н.¹, Зубрицкая Г.П.², Козарезова Т.И.¹, Слобожанина Е.И.²

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования

ул. П. Бровки, 3/3, г. Минск, 220013, Республика Беларусь; e-mail: det.hematology@mail.ru

² Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by

Поступила в редакцию: 16.07.20

Аннотация. При миелодиспластических синдромах (МДС) у детей выявлены нарушения физико-химического состояния липидов и белков эритроцитарных мембран. В эритроцитах детей с этим клоновым заболеванием наблюдается изменение параметров флуоресценции различных по локализации в мембране липофильных зондов, что указывает на модификацию липидов на разной глубине липидного бислоя. В эритроцитарных мембранах детей с МДС происходит нарушение структурного состояния белковых компонентов и окисление белков, что может являться важным звеном в патогенезе анемического синдрома. Данные об изменении физико-химических свойств клеточных мембран у пациентов с МДС могут быть использованы для создания методов дифференциальной диагностики и разработки биофизических тестов прогноза течения данного заболевания.

Ключевые слова: миелодиспластические синдромы, мембраны эритроцитов, флуоресцентные зонды, окисление белков, дети.

Интерес к изучению миелодиспластических синдромов (МДС) не угасает уже не одно десятилетие, что связано с редкостью и гетерогенной природой этих заболеваний. МДС представляют собой клоновые заболевания крови, возникающие в результате мутации гемопоэтической стволовой клетки. Это заболевание характеризуется неэффективным гемопоэзом, цитопенией в крови вследствие повышения апоптотической активности гемопоэтических предшественников и прогрессированием в острый лейкоз. Показатель заболеваемости МДС наиболее высокий среди лиц пожилого и старческого возраста, хотя этот диагноз встречается в любой возрастной группе, в том числе у молодых людей и детей [1]. В результате многолетних исследований происходило накопление как отдельных клинических случаев, так и международных программных наблюдений, позволивших достоверно обобщать и анализировать данные изучения различных аспектов МДС. Это обеспечило возможность выявления механизмов патогенеза и выделения общих и отличительных черт различных вариантов МДС. Согласно современным представлениям, МДС развивается в результате генетических дефектов на уровне стволовой клетки, следствием чего является формирование основного феномена МДС - наличия клеток одновременно в процессе апоптоза и в S фазе митоза, а также парадоксального сочетания цитопении в периферической крови с гиперклеточным костным мозгом. В развитии этого феномена решающее значение имеют процессы апоптоза. С течением времени в ответ на гибель созревающих клеток в костном мозге повышается пролиферативная активность ранних клеток-предшественниц и происходит селекция популяций со сниженной способностью к дифференцировке, в результате чего происходит трансформация в острый лейкоз.

Клинико-лабораторная манифестация, течение и прогноз МДС весьма разнородны. Однако наиболее характерным и частым проявлением этой патологии является анемический синдром с дисплазией красного ростка кроветворения. К механизмам развития анемии при МДС относится: эритропоэз, уменьшение периода жизни эритроцитов и их лизис, вытеснение нормального гемопоэза и замещение его патологическими опухолевыми клетками, нарушение метаболизма железа, низкая чувствительность эритропоэтиновых рецепторов к эндогенному эритропоэтину или недостаточная его продукция, супрессия эритроидных предшественников провоспалительными и апоптотическими цитокинами (TNF- α , IL-1, IFN- γ и другие), хронические кровотечения [2]. К настоящему времени имеется обширная информация об особенностях кариотипа и основных хромосомных аномалиях при различных вариантах МДС. Молекулярно - генетические, иммунологические и метаболические механизмы нарушения эритропоэза при МДС приводят к клинической и лабораторной манифестации анемии с признаками дизэритропоэза. Изменение морфологии эритроцитов при МДС характеризуется анизо- и пойкилоцитозом, встречается диморфизм клеточной популяции, эллиптоциты, макроциты, а также ядродержащие эритроидные предшественники в крови. При исследованиях морфологии эритроцитов у пациентов с МДС в 90% случаев обнаруживаются множественные изменения формы клеток. Например, овалоцитоз встречается у 75% пациентов с вариантами МДС, сопровождающимися делецией хромосомы 20. Нарушения структуры мембранных белков и липидов при МДС регистрируются примерно в 20 % случаев, среди белков – это дефицит белков полос 3, 4.1, 4.2 и 7 [3]. Оценка структуры и свойств мембран эритроцитов крови крайне важна как для определения состояния пациентов, так и для выбора тактики и контроля эффективности лечения их при МДС. Ключевая роль в регуляции всех процессов, происходящих в мембранах, принадлежит их текучести (микровязкости). Этот комплексный показатель отражает как структуру, так и диффузные аспекты

липидных составляющих мембран. Микровязкость мембран является интегральным показателем, зависящим от фосфолипидного состава, ненасыщенности липидов и содержания холестерина в мембранах. Длительное влияние аномальных продуктов метаболизма приводит к модификации липидного бислоя мембран клеток крови при различных патологиях, особенно при патофизиологических и клинических проявления опухолевых процесса [4, 5].

Целью настоящей работы являлось установление биофизических критериев, отражающих нарушение физико-химического состояния компонентов эритроцитарных мембран при МДС.

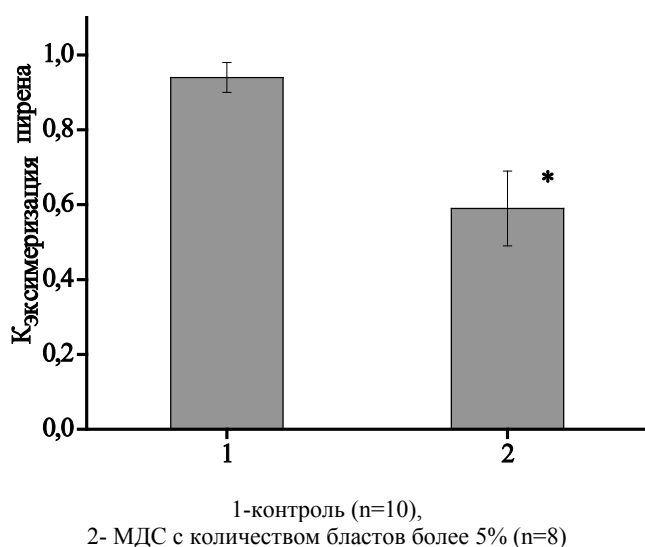
Объектом исследования служили образцы периферической крови (0,3-0,5 мл) детей с первичными МДС, которые находились под наблюдением в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии и практически здоровых детей в возрасте от 5 до 15 лет, которые составили контрольную группу. Мембраны эритроцитов изолировали по методу Доджа и сотр. ,

Исследования состояния мембран эритроцитов проводились при помощи флуоресцентных методов. Спектры флуоресценции триптофанового компонента мембранных препаратов регистрировали при возбуждении светом $\lambda=297$ нм (в этой области практически отсутствует поглощение тирозина). Измерение интенсивности флуоресценции белков производили при $\lambda = 340-345$ нм. Измерение параметров зондовой флуоресценции мембран эритроцитов проводили на спектрофлуориметре LSF-222 ("СОЛАР" Беларусь), спектрофотометрические измерения на спектрофотометре SPECORD M-40 (Германия). В работе были использованы следующие флуоресцентные зонды: пирен, 1,6-дифенил-1,3,5 гексатриен (ДФГ), 1-(4-триметиламмоний- 6-фенил-1,3,5-гексатриен (ТМА-ДФГ), 6-додеканол-2-диметиламинонафтаген (лаурдан), N-(1-пирен) -малеимид (ПМ). Уровень SH-групп белков исследован с помощью двух независимых методов: флуоресцентного (с использованием зонда N-(1-пирен)-малеимида (ПМ)) и спектрофотометрического (с помощью реактива Элмана).

В результате проведенных исследований установлено, что средние значения величин эксимеризации ($K_{\text{экс}}$) пирена ($0,87 \pm 0,19$ отн.ед.) в группе пациентов с МДС не имели статистически значимых различий с контрольными значениями ($0,94 \pm 0,04$ отн.ед.). При анализе изменения флуоресцентного показателя пирена, связанного с эритроцитарными мембранами, в зависимости от количества бластных клеток в костном мозге (КМ) при МДС оказалось, что значения $K_{\text{экс}}$ пирена, включенного в тени эритроцитов детей, зависели от количества бластных клеток и были снижены по сравнению с контролем при вариантах, сопровождающихся увеличением бластов КМ более 5% ($0,59 \pm 0,16$ отн.ед.) (рис. 1).

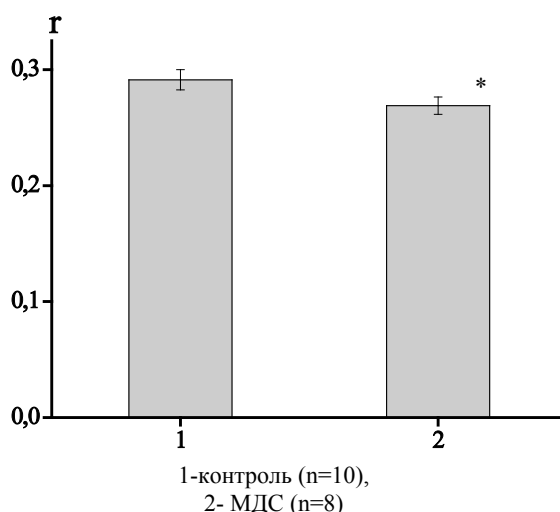
Известно, что эксимеризация пирена зависит от скорости латеральной диффузии зонда в гидрофобном компартменте липидного бислоя мембраны, и поэтому его изменение может говорить о подвижности жирнокислотных цепей. Значения $K_{\text{экс}}$ пирена находятся в обратной зависимости от микровязкости гидрофобной области липидного бислоя мембраны. Можно предположить, что этот факт объясняется более выраженными диспластическими изменениями в клетках эритроидной линии при наличии бластоа КМ.

Для выявления нарушений физико-химического состояния липидного бислоя эритроцитарных мембран у детей, страдающих вариантом МДС с избытком бластов, в КМ, были проведены исследования с другим флуоресцентным зондом – ТМА-ДФГ. Установлено, что средние значения анизотропии флуоресценции ТМА-ДФГ были снижены в мембранах эритроцитов детей, страдающих МДС, по сравнению с мембранами эритроцитов детей контрольной группы (рис. 2).



* статистические различия анализируемого показателя по отношению к контролю $p < 0,05$

Рисунок 1. Средние значения коэффициента эксимеризации пирена, включенного в изолированные мембраны эритроцитов здоровых детей и пациентов с МДС



* статистические различия анализируемого показателя по отношению к контролю $p < 0,05$

Рисунок 2. Анизотропия флуоресценции ТМА-ДФГ, включенного в тени эритроцитов обследованных детей

Так как известно, что анизотропия флуоресценции ТМА-ДФГ отражает упаковку жирно-кислотных цепей мембранных липидов, то полученные данные свидетельствуют об изменении микровязкости липидного бислоя в мембранах эритроцитов. Это подтверждается выявлением увеличения интенсивности флуоресценции ТМА-ДФГ и ДФГ, включенных в мембраны эритроцитов детей, страдающих МДС, по сравнению с группой практически здоровых детей (табл. 1).

В экспериментах с ДФГ по исследованию микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов детей с МДС получены сходные результаты с флуоресцентным зондом ТМА-ДФГ. Обнаружено, что поляризация флуоресценции ДФГ была снижена в эритроцитарных мембранах детей при данном заболевании примерно на 30% по сравнению с практически здоровыми детьми.

Параллельно нами были проведены опыты по связыванию флуоресцентного зонда лаурдана с эритроцитами детей, страдавших МДС. Известно, что флуоресценция лаурдана используется для выявления изменений в упорядоченности фосфолипидов. Амфифильный флуоресцентный зонд лаурдан встраивается в мембрану в гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя, при этом остаток лауриновой кислоты располагается в области углеводородных цепочек жирных кислот фосфолипидов, а его флуоресцентный нафталиновый остаток находится на уровне полярных головок фосфолипидов [6, 7]. Установлено, что степень генерализованной поляризации флуоресценции (GP) лаурдана в мембранах эритроцитов детей с МДС увеличена по отношению к контролю.

Результаты исследований указывают на то, что в мембранах эритроцитов детей с МДС, происходит изменение микровязкости липидов. Зарегистрированные нами изменения параметров флуоресценции различных по локализации в мембране липофильных зондов дает основание думать о модификации липидов на разной глубине липидного бислоя.

Известно, что в состав клеток животного происхождения и биологических жидкостей входит целый ряд веществ, люминесцирующих как в видимой, так и в ультрафиолетовой области спектра. В качестве показателя, характеризующего структурное состояние белковых компонентов эритроцитарных мембран, была выбрана собственная и зондовая люминесценция. Установлено, что значение интенсивности флуоресценции белков эритроцитарных мембран в группе детей с МДС ($2,48 \pm 0,12$ отн. ед.) было повышено по отношению к контролю ($1,78 \pm 0,04$ отн. ед., $p = 0,03$). Это позволяет заключить, что в мембранах эритроцитов детей с МДС независимо от варианта течения заболевания происходит модификация структурного состояния белковых компонентов, что может являться причиной диспластических изменений эритроцитов, выявляемых при морфологическом исследовании ПК и КМ. Это подтверждается следующими результатами исследования структурного состояния эритроцитарных мембран.

Таблица 1. Интенсивность флуоресценции липофильных зондов ДФГ и ТМА-ДФГ, включенных в изолированные мембраны эритроцитов обследованных детей

Обследованные группы детей (n- количество пациентов в группе)	Интенсивность флуоресценции ДФГ ($I_{фл.}$), отн.ед. ($\lambda_{возб.} / \text{per } 365/428$)	Интенсивность флуоресценции ТМА-ДФГ ($I_{фл.}$), отн.ед. ($\lambda_{возб.} / \text{per } 365/428$)
Контрольная группа, n=14	$0,31 \pm 0,003$	$0,61 \pm 0,01$
Дети с МДС, n=8	$0,36 \pm 0,003$	$0,97 \pm 0,08^*$

* статистические различия анализируемого показателя по отношению к контролю $p < 0,01$

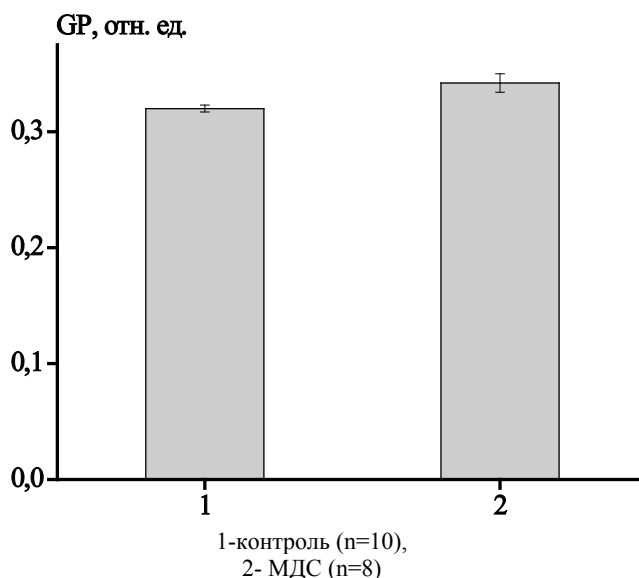


Рисунок 3. Генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана (GP), встроенного в мембраны эритроцитов периферической крови обследованных детей ($\lambda_{\text{возб.}} = 340 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{рег.}} = 440 \text{ нм}$ и $\lambda_{\text{рег.}} = 490 \text{ нм}$)

Известно, что в патогенез многих заболеваний, в том числе и МДС, включаются активные формы кислорода (АФК), что может приводить к различным окислительным процессам, одним из которых является окисление белков [8]. Поскольку SH-группы белков модифицируются при взаимодействии с АФК, то, выявление окисления белков нами проведен по изменению уровня тиоловых групп в белках мембран эритроцитов детей при МДС. Из-за доступности белков к АФК может происходить модификация аминокислот, сшивание и деградация белков. Тиоловые группы в цистеиновых остатках являются одним из мест, которые имеют наибольшую вероятность модификации. Результаты проведенных исследований показали, что интенсивность флуоресценции ПМ, связанного с SH-группами белков, уменьшается в эритроцитах детей, страдающих МДС по сравнению с контрольными образцами (рис. 4). Аналогичные результаты по снижению SH-групп были получены при использовании спектрофотометрического метода. Обнаружено, что у детей с МДС общее количество SH- групп в эритроцитарных мембранах снижалось примерно на 20-40 % по сравнению с контрольной группой. Полученные данные свидетельствуют о том, что в эритроцитарных мембранах при МДС у детей происходит окисление белков, что может являться важным звеном в патогенезе анемического синдрома.

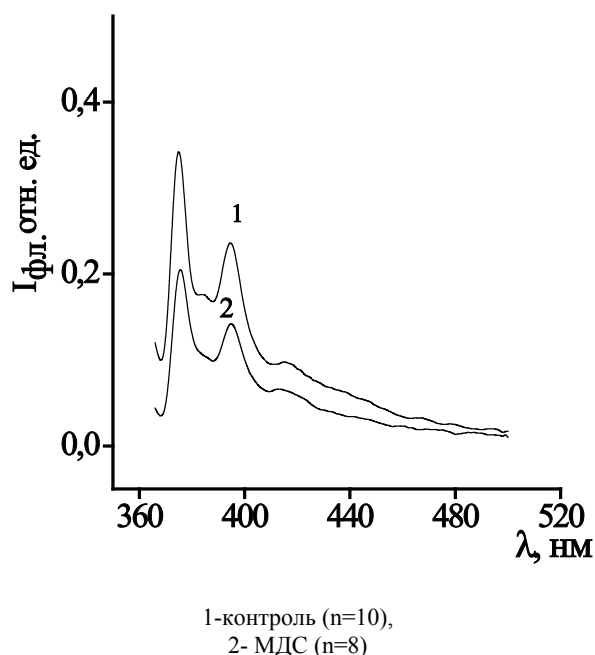


Рисунок 4. Спектры флуоресценции N-(1-пирен) малеимида, связанного с SH-группами белков эритроцитарных мембран обследованных групп детей ($\lambda_{\text{возб.}} = 342 \text{ нм}$)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в мембранах эритроцитов периферической крови детей с МДС происходит изменение микровязкости липидов на разной глубине липидного бислоя в зависимости от их локализации. Также в мембранах эритроцитов детей с МДС независимо от варианта течения заболевания обнаружено нарушение структурного состояния белковых компонентов, что может являться причиной диспластических изменений эритроцитов, выявляемых при морфологическом исследовании периферической крови и костного мозга. Данные об изменении физико-химических свойств мембран эритроцитов у пациентов с МДС могут быть использованы для создания методов дифференциальной диагностики или разработки биофизических тестов прогноза течения данного заболевания.

Список литературы / References:

1. Geyer M.B., Jacobson J.S. Epidemiology of Hematological Malignancies of children, Adolescents and Young Adults, In: Hematological Malignancies in Children, Adolescents and Young Adults, Ed. M.S. Cairo, Sh.L. Perkins. *Word Scientific Publishing*, 2012, pp.1-15.
2. Visconte V., Tiu R.V., Rogers H.J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Res*, 2014, vol. 49 (4), pp. 216-227. DOI: 10.5045/br.2014.49.4.216.
3. Knight J., Czuchlewski D.R. Acquired elliptocytosis of myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2013, vol. 121 (4), pp. 140-145. DOI: 10.1155/2017/3625946.
4. Боровская М.К. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и её изменения при патологиях разного генеза. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, 2010, 73(3), с.334-354 [Borovskaya M.K. Structural-functional characteristics of erythrocyte membrane and its changes in pathologies of different genesis. *Byulleten' VSNTS SO RAMN*, 2010, vol. 73, no. 3, pp. 334-354 (In Russ.)].
5. Слобожанина Е.И., Климкович Н.Н., Зубрицкая Г.П., Козарезова Т.И. Нарушение эритропоэза и изменение физико-химических свойств мембран эритроцитов у пациентов с миелодиспластическими синдромами, *Морфологические основы патологии*: ред. В.П. Волкова, Новосибирск: СиБАК, 2015, гл. 7, с. 136-157. [Slobozhanina E.I., Zubritskaya G.P., Klimkovich N.N., Kozarezova T.I. Violation of erythropoiesis and a change in the physicochemical properties of erythrocyte membranes in patients with myelodysplastic syndromes, *Morphological basis of pathology*: ed. V.P. Volkov, Novosibirsk: SibAK, 2015, ch. 7, pp. 136-157. (In Russ.)]
6. Zwolinska D., Grzeszczak W., Szczepanska M., Kilis-Pstrusinska K., Szprynger K. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis. *Pediatr. Nephrol*, 2006, vol. 21, pp. 705-710. DOI: 10.1007/s00467-006-0053-2.
7. Зубрицкая Г.П. Биофизические характеристики клеток крови и биологических жидкостей как показатели патологических состояний человека. автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Минск, 2016, 26 с. [Zubritskaya G.P. *Biophysical parameters of blood cells and biological fluids as indicators of human pathological states: Abstract PhD*. Minsk, 2016, 26 p. (In Russ.)]
8. Bertram J.S. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 2000, vol. 21, pp. 167-223. DOI: 10.1016/s0098-2997(00)00007-8.

FEATURES OF THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES CHILDREN

Klimkovich N.N.¹, Zubritskaya G.P.², Kozarezova T.I.¹, Slobozhanina E.I.²

¹ Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education

Brovki str., 3/3, 220013, Minsk, Belarus; e-mail: det.hematology@mail.ru

² Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Akademicheskaya str., 27, 220072, Minsk, Belarus; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by

Abstract. We found violations of the physical and chemical state of lipids and red cells membrane proteins in myelodysplastic syndromes (MDS) in children. In red blood cells of children with this clonal disease, there is a change in the fluorescence parameters of lipophilic probes of different localization in the membrane, which indicates a modification of lipids at different depths of the lipid bilayer. In the red cells membranes of children with MDS, there is a violation of the structural state of protein components and protein oxidation, which may be an important link in the pathogenesis of anemic syndrome. Data on changes in the physical and chemical properties of cell membranes in patients with MDS can be used to create methods for differential diagnosis and to develop biophysical tests to predict the course of this disease.

Key words: myelodysplastic syndromes, red cells membranes, fluorescent probes, protein oxidation, children

ОЦЕНКА РЕОЛОГИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ В СРАВНЕНИИ С АНАЛОГИЧНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Нагорнова П.В., Белкин А.В., Дубровский В.Н., Елифанов А.В., Шалабодов А.Д.

Тюменский государственный университет

ул. Пирогова, 3, г. Тюмень, 625000, РФ; e-mail: blatedrane@gmail.com

Поступила в редакцию: 18.07.20

Аннотация. В статье представлена оценка деформабильности эритроцитов крови больных железодефицитной анемией и сравнение с аналогичными показателями крови у здоровых людей. Всего было обследовано 60 человек обоего пола из них 30 испытуемых были здоровыми, и 30 с железодефицитной анемией. Оценка изменения показателя деформабильности эритроцитов проводилась с помощью метода лазерной дифрактометрии на специальном устройстве. Показано, что у пациентов с железодефицитной анемией показатель индекса деформабильности эритроцитов достоверно снижался по сравнению с контрольными показателями.

Дополнительно был проведен флуоресцентный спектральный анализ крови пациентов с железодефицитной анемией и его интеграция в реологические характеристики. Выявлено, что у людей с железодефицитной анемией максимум интенсивности флуоресценции смещается в более коротковолновую область спектра.

Ключевые слова: дефицит железа, анемия, деформабильность, флуоресценция, эритроциты, реологические свойства.

Цитоплазма эритроцитов богата гемоглобином, красным пигментом, содержащим атом двухвалентного железа, который способен связывать кислород и придает клеткам красный цвет. Недостаток железа в организме приводит к появлению дефицита железа, который встречается почти у половины населения мира. Если организм уже ощущает недостаток железа, но болезнь еще не успела развиваться, то в этом случае образуется дефицит железа. Не менее 4% женщин репродуктивного возраста, 20-30% беременных женщин (30-50% в конце беременности) и 1-2% мужчин имеют выраженный дефицит железа.

По причине дефицита железа развивается около 70% всех анемий. Из-за небольшого количества этого микроэлемента молекулы гемоглобина больше не образуются. В результате кровь начинает нести гораздо меньше кислорода. Дефицит железа в других тканях приводит к проблемам с кожей, волосами, сердцем и пищеварением.

По данным ВОЗ, около 1,8 миллиарда человек во всем мире страдают от анемии. Скрытый дефицит железа (сидеропения) встречается у 3,6 млрд человек [1].

Эритроциты являются самым многочисленным типом клеток крови. Оценить функциональное состояние эритроцитов позволяют некоторые детерминанты крови или показатели реологических свойств. Особая способность эритроцитов к упругой деформации позволяет им выполнять свою основную функцию - доставку необходимых веществ для жизнедеятельности организма в целом, включая капиллярную сосудистую систему, диаметр которой значительно меньше диаметра эритроцитов. Данная способность и получила название деформабильность.

Деформационная способность эритроцитов обусловлена упругими свойствами мембраны этих клеток и наличием особой белковой структуры, которая образует внутреннюю сторону мембраны и называется цитоскелетом [2].

Показатель изменения деформабильности является одной из наиболее лабильных характеристик крови, а также она зависит от воздействия различных факторов и ряда патологий. В нашей работе данным фактором является железодефицитная анемия.

Однако до настоящего времени мало изучены вопросы, связанные с влиянием железодефицитной анемии на вязкоэластические свойства мембран эритроцитов человека.

Важным моментом при проведении исследований деформабильности эритроцитов является объективная оценка этого показателя. Метод, который позволяет провести оперативную и информативную оценку обратимой деформабильности эритроцитов основан на лазерной дифрактометрии. В его основе заложен принцип дифракции лучей гелий-неонового лазера на эритроцитах, выступающих в качестве взвешенных в вязкой среде рассеивателей. Данный метод максимально приближен к ситуации «*in vivo*».

Способность эритроцитов к деформируемости определяется внутренней вязкостью, вязкоупругими свойствами мембраны и отношением объема клетки к ее площади. Чем больше отношение площади поверхности эритроцита к его объему, тем более выражены его деформируемые свойства. Эритроциты модифицированной формы характеризуются повышенной устойчивостью к деформируемости.

Другим определяющим фактором деформируемости эритроцитов являются вязкопластические свойства мембраны. Эластичные свойства мембраны определяют ее устойчивость к деформируемости, а вязкостные

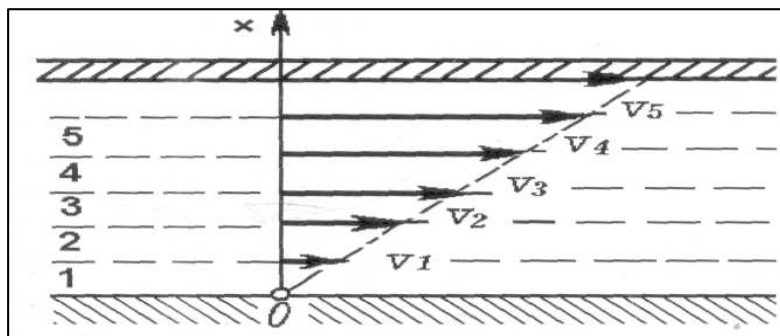


Рисунок 1. Ячейка Куэтта с помещенной между подвижной и неподвижной прозрачными пластинами суспензии эритроцитов

свойства характеризуют устойчивость эритроцитов к деформируемости. Вязкоупругие свойства мембраны определяются, прежде всего, состоянием мембранного скелета и его взаимодействием с другими структурными элементами клетки [3].

При прохождении эритроцитов через микроциркуляторный кровоток им приходится преодолевать деформирующий эффект, возникающий в результате взаимодействия со стенками кровеносных сосудов и друг с другом. Наличие градиентов скорости также оказывает деформирующее действие на эритроциты. Свойство эритроцита как гиперэластичного твердого тела объясняет возможность успешного преодоления этих эффектов при прохождении через микроциркуляторное русло. Примером ситуации, когда эритроцит находится в сдвиговом потоке, является ячейка Куэтта с суспензией эритроцитов, подвешенной между подвижной и неподвижной прозрачными пластинами, подвешенной в вязкой среде с фиксированной вязкостью (20 сантипуаз) [4]. Устройство ячейки Куэтта приведено на рисунке 1.

Эритроциты под действием деформирующего эффекта вытягиваются, о чем можно судить, анализируя дифракционную картину, полученную при прохождении лазерного луча через суспензию эритроцитов, взвешенных в вязкой среде. Дифракционная картина имеет вид системы концентрических колец. Расстояние между кольцами связано со средним диаметром красных кровяных клеток, которые характеризуют эту популяцию. Эта зависимость обратно пропорциональна: чем меньше измеренный диаметр эритроцитов, тем больше диаметр дифракционного кольца. Дифракционная картина отражает форму диффузоров, подвешенных в вязкой среде, а форма, в свою очередь, зависит от степени напряжения деформирующего эффекта. Количество эритроцитов не влияет на формирование дифракционной картины. Изображение дифракционной картины приведено на рисунке 2.

Исследование проводилось следующим образом: кровь помещалась в раствор Ficoll-400. Далее эта суспензия помещалась при помощи катетера в зазор между вращающейся и неподвижной пластинами ($t=36,6^{\circ}\text{C}$). Изменяя скорость вращения нижней пластины мы на основании закона вязкого трения Ньютона, моделировали различные деформирующие условия, возникающие в зазоре между пластинами. Эритроциты под действием деформирующего воздействия вытягиваются, о чем можно судить, анализируя дифракционную картину, полученную при прохождении луча лазера через суспензию эритроцитов, взвешенных в вязкой среде [5]. Блок-схема устройства для оценки деформируемости эритроцитов приведена на рисунке 3.

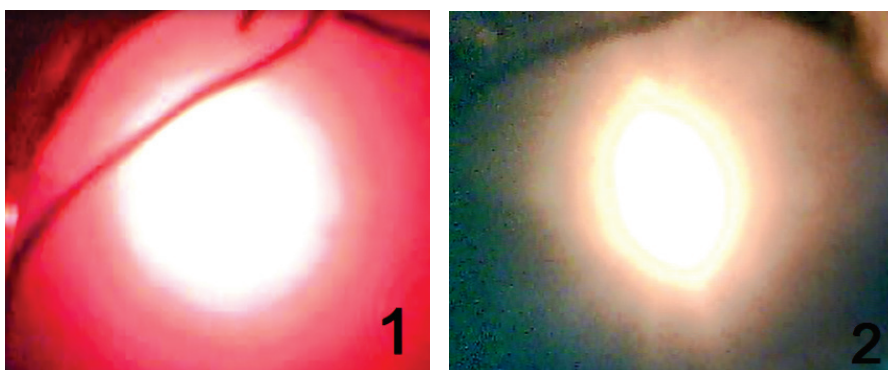


Рисунок 2. Реальное изображение дифракционной картины, получаемое при прохождении луча лазера через слой эритроцитов и выводимое на монитор для программного анализа: 1-дифракционная картина от покоящихся эритроцитов; 2-дифракционная картина от эритроцитов, находящихся в сдвиговом потоке

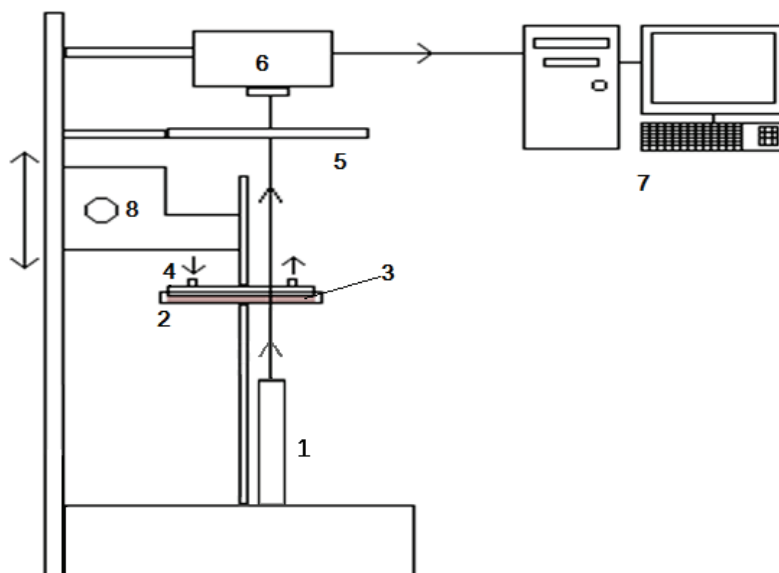


Рисунок 3. Блок-схема устройства для оценки деформируемости эритроцитов (патент РФ №2236009):

1. Полупроводниковый, аналогичный гелий-неоновому ($\lambda \approx 632,8$ нм) лазер; 2. Термостабилизированная стационарная чашка Петри; 3. Проба крови; 4. Термостабилизированная вращающаяся чашка Петри; 5. Экран; 6. Видеокамера; 7. Компьютер; 8. Винт регулировки размера зазора

Забор крови производился на базе клинической ЖД-больницы города Тюмени в течение с марта по май 2019 года. Далее пробы транспортировались в течение часа на кафедру анатомии и физиологии человека и животных Института биологии для проведения дальнейшей работы. Всего было обследовано 60 человек обоего пола (26 мужчин и 34 женщины) в возрасте от 20 до 65 лет. Для проведения сравнительного анализа полученных данных все пациенты были разделены на 2 группы.

Первую группу составили пациенты с ЖДА. И вторая группа - это контроль, то есть люди с нормальным анализом крови.

Точность диагноза и общее состояние пациентов с железодефицитной анемией и здоровых людей были подтверждены сотрудниками РЖД-больницы (биохимические показатели всех исследованных образцов и изучение истории болезни каждого пациента в отдельности).

Дифракционная картина отражает форму взвешенных в вязкой среде рассеивателей, а форма зависит от степени напряжения деформирующего воздействия.

Как показали результаты нашего исследования, у больных анемией деформируемость эритроцитов достоверно снижалась по сравнению с контрольными показателями, что свидетельствовало об изменении реологических свойств самого эритроцита.

Индекс деформируемости эритроцитов на максимальном усилии сдвига (порядка 15 Н/м^2) для пациентов с железодефицитной анемией составляет $0,16 \pm 0,02$.

В норме индекс деформируемости эритроцитов на максимальном усилии сдвига для здоровых людей составляет $0,27 \pm 0,02$. Полученные графики приведены на рисунке 4.

Способность эритроцитов противостоять такому воздействию, т.е. есть реологические свойства клеток, заложены в особенностях структурной организации мембраны. Снижение уровня деформируемости эритроцитов у пациентов с железодефицитной анемией является следствием снижения гематокрита.

Гематокрит отражает не только количество эритроцитов, но и их размер. Если размер эритроцитов уменьшается (как при железодефицитной анемии, т.к. происходит нарушение созревания эритроцитов в красном костном мозге), гематокрит тоже будет снижаться. Следовательно, снижается вязкость самой крови, от которой напрямую зависит показатель деформируемости эритроцитов.

Дополнительно мы измерили интенсивность свечения цельной крови в реакции флуоресцеин-зависимой флуоресценции.

Флуориметрия проводилась как с добавлением активатора, так и без него. В качестве активатора флуоресценции использовался флуоресцеин. 5-7 кристаллов вносили в кювету с исследуемым образцом и непосредственно перед измерением тщательно перемешивали для лучшего связывания с активными центрами белков крови. При этом иногда оставался осадок, так как степень связывания у различных пациентов неодинакова, но на полученных результатах это не отражалось, что было доказано минимальным содержанием артефактов, соответствующим эталону контрольного раствора и максимально четкими спектрами свечения образцов сыворотки крови.

В качестве контроля фонового свечения, использовался физиологический раствор NaCl 0,9 н, который подтверждал отсутствие искажений или сигнализировал о необходимой корректировке параметров.

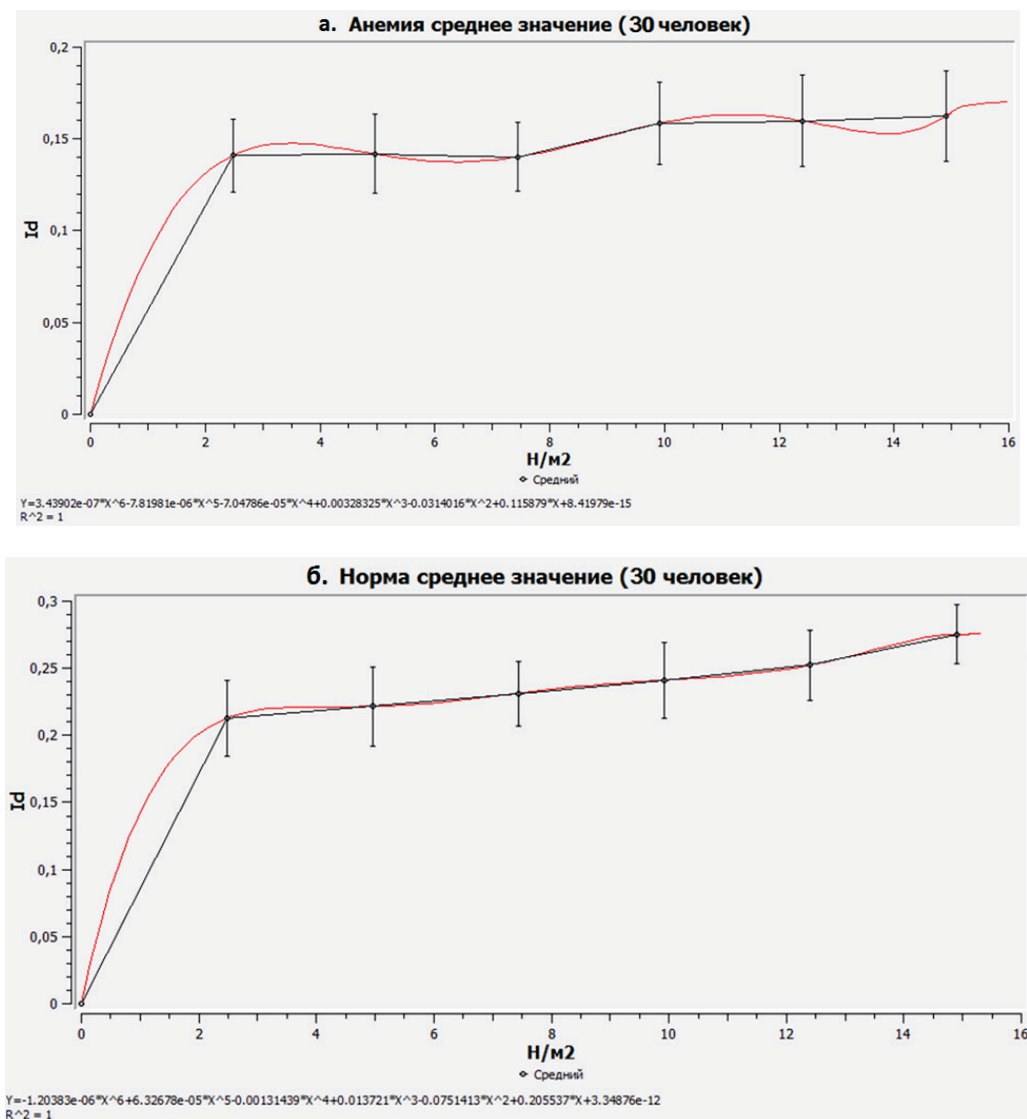


Рисунок 4. Изменение индекса деформальности эритроцитов в зависимости от усилия сдвига для пациентов с железодефицитной анемией (а) и для здоровых людей (б), где: Id – индекс деформальности; H/m^2 – усилие сдвига; красная линия – линия тренда; черная линия – практическое значение

Измерение интенсивности флуоресценции проводилось при помощи спектрофлуорометра Shimadzu RF-5301. Его основные характеристики: монохроматор возбуждения 200-700 нм, монохроматор излучения 220-800 нм. Спектральное разрешение от 1 до 40 нм плавно регулируется изменением ширины щелей монохроматоров. Скорости развертки спектра 12,5, 25, 50, 100, 150, 300 нм/мин. Источник возбуждения – ксеноновая дуговая лампа. В приборе используется 90 градусная схема регистрации флуоресценции.

Следует отметить, что измерение спектров флуоресценции – спектрофлуорометрия – значительно более чувствительный метод, чем абсорбционная спектрофотометрия. С помощью современных спектрофлуорометров можно уверенно реагировать флуоресценцию вещества с концентрацией 10-11 моль/л.

Правильный результат флуоресцентного анализа может быть получен лишь при учете многих факторов, сопутствующих эксперименту. Отметим основные:

1. Для получения истинных спектров флуоресценции и возбуждения необходимо учитывать зависимость от длины волны спектра излучения источника, пропускания монохроматоров и чувствительности фотоумножителя.

2. На сигнал флуоресценции всегда накладываются сигналы, обусловленные флуоресценцией примесей растворителя, фоновой засветкой, релеевским и комбинационным рассеянием света, рассеянием, обусловленным мутностью раствора, рассеянным излучением, прошедшим через монохроматоры и т.д.

3. Спектр флуоресценции, и ее интенсивность могут зависеть от концентрации исследуемого вещества как из-за изменения оптической плотности на длине волны возбуждения, так и из-за межмолекулярных взаимодействий, влияющих на флуоресцентные свойства молекул.

4. На флуоресцентные параметры исследуемого вещества влияют свойства растворителя (его полярность, вязкость, pH наличие растворенных веществ).

По полученным данным рассчитывалась светосумма за 69 сканирований каждой пробы в импульсном режиме. Обработка статистических результатов была проведена с помощью программы Panorama.

Для моделирования строения и оптических спектров флуоресцентных и фоторецепторных белков применяются современные методы молекулярного моделирования, включая комбинированные методы квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ). Согласно данному подходу расчет энергий в квантовой подсистеме проводится по компьютерным программам квантовой химии, а в молекулярно-механической подсистеме – с использованием силовых полей. Подразделение системы на КМ- и ММ-части производится на основании анализа доступных трехмерных моделей белков, в частности, содержащихся в базе данных белковых структур (PDB). Для расчетов свойств флуоресцентных и фоторецепторных белков к КМ-подсистеме относится хромофорная группа и ближайшие к ней аминокислотные остатки [6,7].

Равновесные геометрические конфигурации для модельных белковых систем определены по минимуму полной энергии в приближении КМ/ММ для транс- и цис-конформаций хромофорной группы с учетом её различных протонированных состояний. Для найденных стационарных точек проводились расчеты вертикальных энергий возбуждения, отвечающих переходам S_0-S_1 и S_0-S_2 . С этой целью использовались многоконfigurационные приближения квантовой химии, позволяющие обеспечить достаточно высокую точность вычислений. Рассчитанные положения полос в спектрах поглощения сопоставляются с экспериментальными данными. Сканирование фрагментов поверхностей потенциальной энергии возбужденных электронных состояний позволяет сформулировать гипотезы о механизме разгорания флуоресцирующего варианта изучаемого белка [8].

По результатам нашего исследования, диапазон излучения для больных с анемией находился в пределах от 498 нм до 525 нм (среднее – 511 нм). Для здоровых людей был характерен диапазон от 573 нм до 585 нм (среднее – 580 нм).

Изложенные результаты исследования позволили нам сформулировать следующие выводы:

1. Деформабильность эритроцитов (на максимальном усилии сдвига) больных железодефицитной анемией достоверно снизилась до $0,16 \pm 0,02$, по сравнению с деформабильностью здоровых людей $0,27 \pm 0,02$

2. В крови больных железодефицитной анемией максимум интенсивности флуоресценции смещается в более коротковолновую область спектра в диапазон 498-525 нм, в сравнении с 573-585 нм для здоровых людей.

В дальнейшем методы лазерной дифрактометрии и флуоресцентной спектроскопии эритроцитов будут использоваться для более глубокого изучения реологических свойств крови, которые отражают функциональное состояние организма в целом. Это позволит расширить и оптимизировать процесс исследования.

Также эти методы могут способствовать более правильной оценке изменчивости реологических характеристик при различных патологиях, более оптимально влиять на формирование количественных характеристик реологических свойств и в то же время служить источником новых знаний о морфофункциональном состоянии эритрона.

Список литературы / References:

1. Andreichev N.A., Baleeva L.V. Iron Deficiency Conditions and Iron Deficiency Anemia. *Bulletin of Modern Clinical Medicine*, 2009, no. 3. DOI: 616.155.194.8+616.152.72-074.
2. Belkin A.V., Evpak A.S., Soloviev V.S., Khlistova E.U. Change of rheological blood parameters in some oncopathologies. *National Association of Scientists*, 2015, no. 9. DOI: 28948753.
3. Артюхов В.Г. *Биофизика*. М.: Академический проект, 2009, 294 с. [Artyukhov V.G. *Biophysics*. M.: Academic Project, 2009, 294 p. (In Russ.)]
4. Vohmitsev A.P., Saifiev R.R., Frolova O.V. Exogenous regulation of the erythrocyte deformability. *Fundamental Sedations*, 2004, no. 4.
5. Belkin A.V., Voitenko P.A., Dubrovsky V.N., Elifanov A.V., Maslakova K.Yu., Okrugina A.V., Shalabodov A.D. Development of an installation for estimation of the erythrocyte deformability using the phenomenon of rotation of the polarization plane of the plane-polarized light by optically active substances. *VI sezd biofizikov Rossii sbornik nauchnih trudov*, 2019, no. 1. DOI: 41335680.
6. Векшин Н.Л. *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров*. М.: Фотон век, 2014, 188 с. [Vekshin N.L. *Fluorescent spectroscopy of biopolymers*. M.: Photon century, 2014, 188 p. (In Russ.)]
7. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskarev I.M. Chemiluminescence induced by Fenton reaction - mathematical simulation of the process; features, parameters and conditions of application for biomedical research. *Original Researches*, 2014, no. 4. DOI: 579.222.001.57:61.
8. Дюбо Т.С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. Собственная флуоресценция белков. *Вестник Харьков. нац. ун-та. Сер. Биология*, 2006, № 3. [Dyubko T.S. O nekotoryh aspektah primeneniya fluorescentnogo analiza v kriobiologii. Sobstvennaya fluorescenciya belkov. *Vestnik Har'kov. nac. un-ta. Ser. Biologiya*, 2006, no. 3. (In Russ.)]

EVALUTION OF THE RHEOLOGICAL DETERMINANTS OF HUMAN BLOOD WITH
IRONDEFICIENCY ANEMIA IN COMPARASION WITH SIMILAR BLOOD PARAMETERS OF
HEALTHY PEOPLE

Nagornova P.V., Belkin A.V., Dubrovsky V.N., Elifanov A.V., Shalabodov A.D.

Tyumen State University

Pirogova str., 3, Tyumen, 625000, Russia; e-mail: blatedrane@gmail.com

Abstract. The article presents an assessment of the deformability of red blood cells in patients with iron-deficiency anemia and a comparison with similar blood parameters in healthy people. In total 60 people of both sexes were examined, 30 of them were healthy and 30 with iron deficiency anemia. Changes in erythrocyte deformability were evaluated by laser diffractometry on a special device. It was shown that in patients with iron deficiency anemia the erythrocyte deformability index parameter authentically decreased in comparison with the control parameters.

Additionally, fluorescence spectral analysis of blood in patients with iron deficiency anemia and its integration into rheological characteristics was performed. It was revealed that in people with iron deficiency anemia the maximum fluorescence intensity shifted to the shorter wavelength region of the spectrum.

Key words: *iron deficiency, anemia, deformability, fluorescence, erythrocytes, rheological properties.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ И СИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ У *RAPHANUS SATIVUS*.

Трофименко Я.В., Калинкевич О.В., Чиванов В.Д., Калинкевич А.Н.,
Данильченко С.Н.

Институт прикладной физики НАН Украины

ул. Петропавловская, 58, г. Сумы, 40000 Украина; e-mail: kalinkevich@gmail.com

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. В нашей работе были исследованы биометрические показатели и содержание фотосинтетических пигментов в проростках редиса (*Raphanus sativus* var. *radicula*), семена которого были обработаны растворами хитозана различной концентрации в различных органических кислотах (уксусная, аскорбиновая, молочная) с добавлением комплексного удобрения и рентгеновским излучением (характеристическое излучение Mo, ускоряющее напряжение 20 кВ, ток 1 мА). При этом всхожесть необлученных семян составила 50%, облученных в течение 20 мин – 80%, в течение 40 мин – 20%. Семена, обработанные 0,2% и 2% растворами хитозана в 1% уксусной и молочной кислотах, не взошли вовсе. Семена, обработанные 0,2% раствором хитозана в аскорбиновой кислоте и облученные, взошли, хотя всхожесть их была ниже – 10-20%. В тоже время в этих ростках обнаружена наибольшая концентрация фотосинтетических пигментов. Обработка семян минеральным удобрением с последующим высушиванием и облучением привела к снижению всхожести в опытных облученных вариантах – всхожесть составила 20 и 30% в зависимости от дозы (20 и 40 мин соответственно) при облучении после обработки; 30 и 40% при облучении до обработки. Всхожесть семян, инкрустированных 2% раствором хитозана в 2% аскорбиновой кислоте, составила 50%, облученных в различных дозах – 10%. Облучение семян в большинстве случаев приводит к снижению содержания основных фотосинтетических пигментов в проростках. Однако в случае использования минеральных удобрений и раствора хитозана в аскорбиновой кислоте в комбинации с облучением, напротив, приводит к повышению содержанию пигментов по сравнению с контролем.

Ключевые слова: рентгеновское излучение, радиационные технологии, хитозан, предпосевная обработка семян, *Raphanus sativus*.

Исследование действия радиационного излучения на биологические объекты является актуальным, так как в последние годы активно развиваются технологии с применением физических факторов, в частности, ионизирующего и неионизирующего излучений. Технологии облучения могут быть использованы для повышения урожайности, увеличения сроков хранения продукции, уничтожения патогенной микрофлоры и насекомых-вредителей, сокращения потерь при хранении плодов и овощей, удлинения сроков реализации продуктов, стерилизации рационов для армии и космонавтов и т.п. Применение технологий с использованием физических факторов базируется на междисциплинарных фундаментальных исследованиях на стыке физики, биологии, химии, сельскохозяйственных наук [1]. Действие излучения проявляется на всех уровнях внутриклеточного биосинтеза – синтеза и изменения активности ферментов, синтеза растительных пигментов и т.д. В последнее время большой интерес вызывает радиомодифицирующее действие различных биологически активных веществ [2]. Одним из таких радиомодификаторов может быть хитозан.

Хитозан – биологический полимер, получаемый деацетилированием хитина (компонента экзоскелетов ракообразных, насекомых, клеточной стенки грибов). Высокая биологическая активность хитозана, нетоксичность, биосовместимость, некоторые антибактериальные свойства способствуют широкому его использованию в биологии, медицине, сельском хозяйстве, в частности в растениеводстве для защиты от вредителей болезней, для стимуляции неспецифического иммунитета у растений, для регуляции роста и развития, повышения урожайности [3]. Поликатионная природа хитозана позволяет ему электростатически связываться с цитоплазматической мембраной, проникать в цитоплазму и ядро клетки, взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами. Препараты хитозана используют для предпосевной обработки семян [4-6], опрыскивания растений, внесения в почву. Хитозан экологически безопасен, так как распадается в образование нетоксичного глюкозамина. В некоторых работах описано влияние хитозана на фотосинтетическую активность растений, в частности отмечено влияние хитозана на содержание фотосинтетических пигментов у растений хлопчатника на фоне вилта [7]. Это важно, поскольку фотосинтез в значительной мере определяет биопродуктивность растений, наряду с другими физиологическими и биохимическими процессами, экологическими условиями и агротехникой выращивания. На синтез пигментов у редиса определенное влияние оказывали гуматы [8]. Опрыскивание листьев картофеля олигохитозаном (82,20 кДа) полученным из хитозана (337,73 кДа) путем применения γ -облучения 100 кГр, приводило к усилению роста, устойчивости к засухе, отмечалось также влияние на синтез фотосинтетических пигментов [9].

В последнее время способы предпосевной обработки семян получают широкое применение, так как с их помощью можно добиться более ранних всходов, стимулировать растение. Повышение жизнеспособности семян – важная практическая задача.

Редис – первый весенний, популярный и быстрорастущий овощ, активно выращивается в личных подсобных хозяйствах. Используется в биологических экспериментах на космических станциях. Однако выращивание этой культуры остается высокзатратным и низкопродуктивным как из-за несовершенных технологий возделывания, так и из-за биологических особенностей: растянутые сроки появления всходов, сильная зависимость от агроклиматических условий, недостаточная выравненность всходов, низкие темпы роста и развития растений на начальных этапах онтогенеза, поражение грибами и насекомыми [10]. Поэтому важен поиск способов эффективного влияния на эти процессы. Открытый вопрос – влияние различных стимуляторов на редис. Например, предпосевная обработка семян продуктами переработки, полученными в результате гидролиза радиационно обработанного (100 кГр) сырья (ППГРОС) при производстве биотоплива (смесь органических кислот) у редиса приводила к повышению урожайности на 27-84% [11].

В нашей работе были исследованы биометрические показатели и содержание фотосинтетических пигментов в проростках редиса (*Raphanus sativus* var. *radicula*), семена которого были обработаны растворами хитозана различной концентрации в различных органических кислотах (уксусная, аскорбиновая, молочная) с добавлением комплексного удобрения и рентгеновским излучением.

Для обработки были использованы коммерческие семена редиса (красный с белым кончиком). Обработку проводили согласно Табл. 1. Для каждого варианта обработки использовали по 10 шт. семян.

Облучение семян проводили в медицинских шприцах, помещенных в установку для рентгеновского облучения (характеристическое излучение Мо, ускоряющее напряжение лампы 20 кВ, ток 1 мА). Время экспонирования 20 и 40 мин.

0,2%-ные растворы хитозана в 1% кислотах использовали для замачивания семян, 2%-ные вязкие растворы – для формирования пленки на семенах (инкрустация). Контрольные семена обрабатывались только комплексным удобрением. Растворы для замачивания (К, Х31, Х32, Х33) и инкрустации (Х34, Х35, Х36), где К – удобрение¹ 5 мл/л + 500 мг борной кислоты.

Х31 – К+0,2% хитозан (300 кДа) + 0,5% уксусная кислота,

Х32 – К + 0,2% хитозан+ 1% аскорбиновая кислота,

Х33 – К+0,2% хитозан каротин+0,5% уксусная кислота,

Х34 – К +2% хитозан +1% уксусная кислота,

Х35 – К+2%хитозан +2% аскорбиновая кислота,

Х36 – К+ 2% хитозан каротин+1% уксусная кислота.

Хитозан каротин – 2,2 г хитозана+20 мг каротина + несколько капель этилового 96% спирта растирали в ступке до испарения спирта. Замачивали на 3 ч, инкрустация 30 мин с последующим высушиванием в сушильном шкафу при 60 °С.

Обработанные различными способами семена высаживались в контейнеры. Фиксировалось время прорастания семян, длина ростков. Для определения содержания пигментов использовали спектрофотометрический метод (спектрофотометр «Spekol-1500») [12].

Таблица 1. Схема экспериментов и маркировка образцов

Облучение	Замачивание				Инкрустация			
	К	Х31	Х32	Х33	К1	Х34	Х35	Х36
1. Без облучения	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.
Обработка после облучения семян								
2. 20 мин	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.
3. 40 мин	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.
Обработка до облучения								
4. 20 мин	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.
5. 40 мин	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.

¹ Состав удобрения: азот (NH₄ +NO₃) 8%, фосфор (P₂O₅) 5%, калий (K₂O) 5%, янтарная кислота 2 г/л, микроэлементы MgO 1 г/л, В 1 г/л, Fe 0,5 г/л, Zn 0,2 г/л, Mn 0,4 г/л, Mo 0,02 г/л, Co 0,1 г/л, аминокислоты глицин 150 мг/л, аргинин 30 мг/л, триптофан 40 мг/л, ауксины 130 мг/л, гибберелины 18 мг/л, цитокинины 35 мг/л, витамины В1 25 мг/л, В2 35 мг/л, В6 70 мг/л, РР 80 мг/л.

Таблица 2. Всхожесть и биометрические показатели ростков редиса после различной предпосевной обработки

Вариант обработки	Всхожесть, %	Средняя длина ростков, см	Средняя масса одного ростка
1К	50	2,3	0,0118
1К1	70	3,5	0,01
2К	80	3,4	0,0137
2К1	20	4	0,01675
3К	20	2,7	0,01275
3К1	30	2	0,01
4К	40	2,6	0,01238
4К1	30	2,8	0,0108
5К	30	3	0,0082
5К1	40	3	0,01425
1Х35	50	3,2	0,0137
2Х32	10	4	0,0105
2Х35	10	1,5	0,01
3Х32	20	1,4	0,0075
3Х35	10	4	0,0115
4Х32	20	1,5	0,00875
4Х35	10	2,5	0,01

Наблюдалось прорастание всех контрольных вариантов. При этом всхожесть необлученных семян составила 50%, облученных в течение 20 мин – 80%, в течение 40 мин – 20%. Семена, обработанные 0,2% и 2% растворами хитозана в 1% уксусной и молочной кислотах, не взошли вовсе. Семена, обработанные 0,2% раствором хитозана в аскорбиновой кислоте и облученные, взошли, хотя всхожесть их была ниже – 10-20%. В тоже время, в этих ростках обнаружена наибольшее содержание фотосинтетических пигментов. Обработка семян минеральным удобрением с последующим высушиванием и облучением привела к снижению всхожести в опытных облученных вариантах – всхожесть составила 20 и 30% в зависимости от дозы (20 и 40 мин соответственно) при облучении после обработки; 30 и 40% при облучении до обработки. Всхожесть семян, инкрустированных 2% раствором хитозана в 2% аскорбиновой кислоте, составила 50%, облученных в различных дозах – 10%.

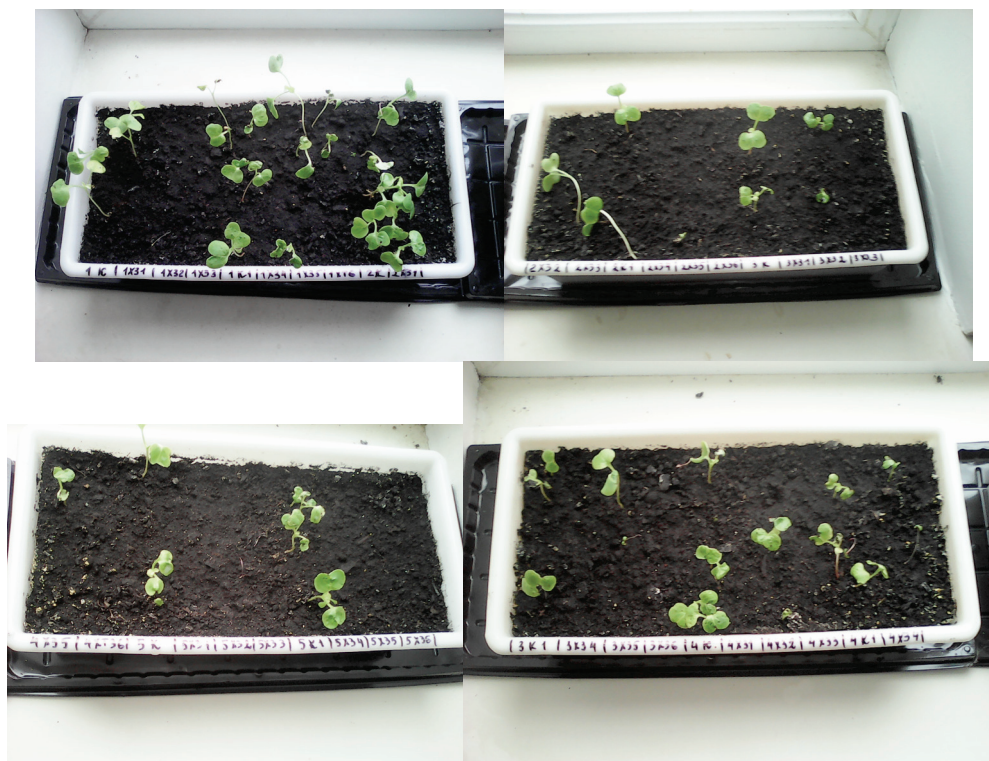


Рисунок 1. Растения редиса на 20-й день

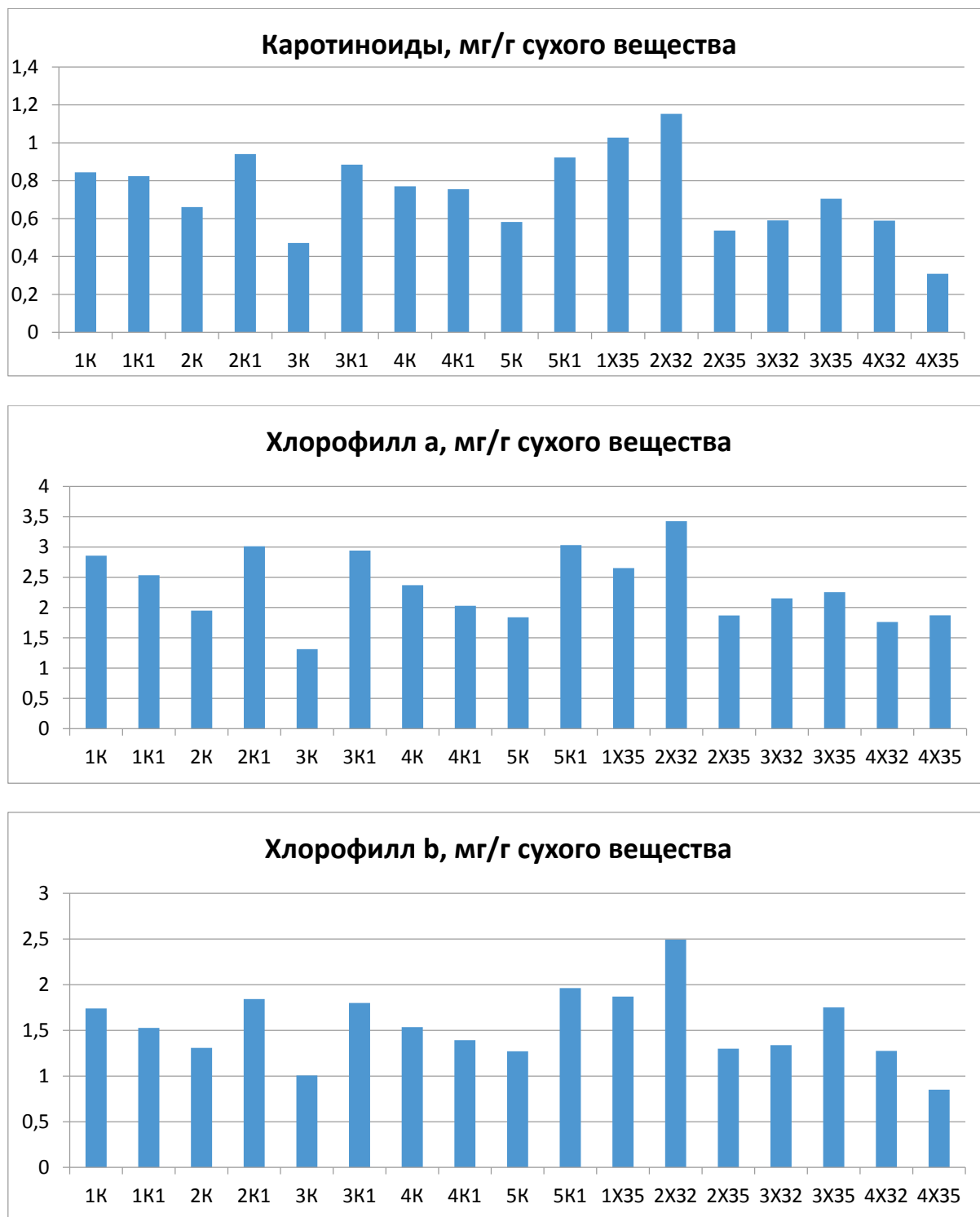


Рисунок 2. Содержание фотосинтетических пигментов в ростках редиса после различной предпосевной обработки

Облучение семян в большинстве случаев приводит к снижению содержания основных фотосинтетических пигментов в проростках. Однако в случае использования минеральных удобрений и раствора хитозана в аскорбиновой кислоте в комбинации с облучением, напротив, приводит к повышению содержанию пигментов по сравнению с контролем.

Список литературы / References:

1. Кудряшов Ю.Б. *Радиационная биофизика (ионизирующие излучения)*. М. Физматлит, 2004, 448 с. [Kudryashov Yu.B. *Radiation biophysics (ionizing radiations)*. М.: Fizmatlit, 2004, 448 p. (In Russ.)]
2. Журавская А.Н., Воронов И.В., Поскачина Е.Р., Слепцов И.В. Влияние гамма-облучения и лиофилизата щерицы запрокинутой на фотосинтез проростков пшеницы. *Наука и образование*, 2015, № 3. [Zhuravskaya A.N.,

Voronov I.V., Poskachina Ye.R., Sleptsov I.V. The influence of gamma-irradiation and lyophilizate of green amaranth on the photosynthesis in wheat sprouts. *Nauka i obrazovanie*, 2015, vol. 3. (In Russ.)]

3. Морозова Е.А. Эколого-биологическая оценка действия хитозановых препаратов на сельскохозяйственные культуры. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Барнаул, 2011. [Morozova Ye.A. *Ecologo-biological estimation of the effect of chitosan preparations on the agricultural plants*, Abstract of PhD thesis, Barnaul, 2011. (In Russ.)]

4. Mahdavi B., Rahimi A. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *Eurasian Journal of Biosciences*, 2013, vol. 7. DOI: 10.5053/ejobios.2013.7.0.9.

5. Defang Zeng, Xinrong Luo, Renjie Tu Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, Article ID 104565. DOI: 10.1155/2012/104565.

6. Martínez González L., Reyes Guerrero Y., Falcón Rodríguez A., Núñez Vázquez M. Effect of seed treatment with chitosan on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings cv. INCA LP-5 in saline medium. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 1, pp. 136-142.

7. Акиншина Н.Г., Рашидова Д.К., Азизов А.А. Капсулирование семян препаратами хитозана и его производных восстанавливает фотосинтез у растений хлопчатника (*Gossypium* L., 1753) на фоне вилта. *Сельскохозяйственная биология*, 2016, т. 51, № 5, с. 696-704. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.5.696rus. [Akinshina N.G., Rashidova D.K., Azizov A.A. Incapsulation of seeds with the preparations of chitosan and its derivatives restores the photosynthesis in cotton plants (*Gossypium* L., 1753) under wilt. *Selskokhozyaystvennaya biologiya*, 2016, vol. 51 (5), pp. 696-704. (In Russ.)]

8. Борисенко В.В., Жолобова И.С. Изучение влияния обогащенного биогумата «Экокс» на работу фотосинтетического комплекса растений редиса. *Научный журнал КубГАУ*, 2015, № 107 (03). [Borisenko V.V., Zholobova I.S. Investigation of the influence of the enriched biohumate “Ekoss” on the photosynthetic complex of radish plants. *Nauchnyy zhurnal KubGAU*, 2015, vol. 107 (03). (In Russ.)]

9. Muley A.B., Shingote P.R., Patil A.P., Dalvi S.G., Suprasanna P. Gamma radiation degradation of chitosan for application in growth promotion and induction of stress tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Carbohydrate Polymers*, 2019, vol. 210, pp. 289-301. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.056.

10. Марьяна-Чермных О.Г., Евдокимова М. А. Эффективность нового способа посева и предпосевной обработки семян редиса. *Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки»*, 2015, № 4. [Maryina-Chermnykh O.G., Yevdokimova M.A. Effectiveness of a new method of sowing and presowing treatment of radish seeds. *Vestnik Mariyskogo gosudarstvennogo universiteta, Seriya “Selskokhozyaystvennye nauki. Ekonomicheskie nauki”*, 2015, vol. 4. (In Russ.)]

11. Лой Н.Н., Санжарова Н.И., Кузнецов А.А., Молин А.А., Винокуров В.А. Эффективность предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур продуктами переработки, полученными в результате радиационных технологий. *Достижения науки и техники АПК*, 2015, т. 29, № 5, с. 29-32. [Loy N.N., Sanzharova N.I., Kuznetsov A.A., Molin A.A., Vinokurov V.A. Effectiveness of presowing treatment of seeds of agricultural plants with radiation technology processing products. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2015, vol. 29 (5). (In Russ.)]

12. Кудряшов А.П. Физиология растений. Лабораторный практикум. Минск: БГУ, 2011, 76 с. [Kudryashov A.P. *Plant physiology. Laboratory practice*. Minsk, BGU, 2011, 76 p. (In Russ.)]

THE INFLUENCE OF X-RAY IRRADIATION ON GERMINATION AND SYNTHESIS OF PIGMENTS IN
RAPHANUS SATIVUS

Trofimenko Ya.V., Kalinkevich O.V., Chivanov V.D., Kalinkevich A.N., Danilchenko S.N.

Institute of applied physics, NAS of Ukraine

Petropavlovska St. 58, Sumy, 40000, Ukraine; e-mail: kalinkevich@gmail.com

Abstract. In our work, we studied the biometric indicators and the content of photosynthetic pigments in radish seedlings (*Raphanus sativus* var. *Radicula*), the seeds of which were treated with solutions of chitosan of various concentrations in various organic acids (acetic, ascorbic, lactic) with the addition of complex fertilizer, and X-ray radiation (characteristic Mo radiation, accelerating voltage 20 kV, current 1 mA). In this case, the germination rate of unirradiated seeds was 50%, irradiated for 20 min - 80%, for 40 min - 20%. Seeds treated with 0.2% and 2% solutions of chitosan in 1% acetic and lactic acids did not germinate at all. Seeds treated with a 0.2% solution of chitosan in ascorbic acid and irradiated, sprouted, although their germination was lower - 10-20%. At the same time, the highest concentration of photosynthetic pigments was found in these sprouts. Seed treatment with mineral fertilizer followed by drying and irradiation led to the decrease in germination in the experimental irradiated variants: germination was 20% and 30% depending on the dose (20 and 40 min, respectively) when irradiated after treatment; 30 and 40% when irradiated before treatment. The germination rate of seeds inlaid with a 2% solution of chitosan in 2% ascorbic acid amounted to 50%, irradiated in various doses - 10%. Irradiation of seeds in most cases leads to a decrease in the content of the main photosynthetic pigments in seedlings. However, in the case of using mineral fertilizers and a solution of chitosan in ascorbic acid in combination with irradiation, on the contrary, it leads to an increase in the content of pigments in comparison with the control.

Key words: X-ray radiation, radiation technology, chitosan, seed treatment, *Raphanus sativus*.

ПАРАМЕТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ДИНАМИКА РОСТА КУЛЬТУРЫ *CHLORELLA SOROKINIANA* ПРИ РАЗЛИЧНОМ СОДЕРЖАНИИ БИОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Беспалова С.В., Романчук С.М., Чуфицкий С.В.

Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283001, ДНР; e-mail: ChufitskyiSergey@yandex.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2020

Аннотация. В работе рассматривается воздействие различных концентраций биогенных веществ на динамику роста культуры микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, а также на содержание хлорофилла и флуоресценцию клеток культуры. С помощью метода флуориметрии произведена оценка фотосинтетической активности клеток культуры. Показано, что низкое содержание нитратов и фосфатов приводит к снижению скорости роста культуры, уменьшению концентрации хлорофилла в пробах воды, а также к снижению скорости электронного транспорта на уровне фотосистемы II, квантового выхода и базовых показателей флуоресценции. Произведена оценка фотосинтетического индекса эффективности (PI) функционирования фотосистемы II. Показано, что показатель PI возрастает при интенсивном нарастании биомассы *Chlorella sorokiniana*, и снижается при снижении скорости роста культуры.

Ключевые слова: флуоресценция, фитопланктон, нитраты, фосфаты, хлорофилл.

Фитопланктон является одним из основных звеньев любой водной экосистемы [1]. В водных экосистемах фитопланктон является главным продуцентом органического вещества, которое образуется в результате фотосинтеза. Состояние фитопланктона может служить одним из показателей экологического благополучия водоема. При действии различных экологических факторов и антропогенных загрязнений в первую очередь изменяются фотосинтетическая активность и концентрация клеток водорослей [2-4]. Из всего многообразия происходящих процессов своим влиянием на динамику биомассы планктона выделяются потребление минеральных питательных веществ и изменение их состава во внешней среде.

При оценке состояния водных объектов, прежде всего, оценивают содержание биогенных веществ и наибольшее внимание уделяют содержанию азота и фосфора. Кроме того, информативным показателем состояния водоема является отношение концентраций данных элементов – N : P [5-7]. Также уделяется внимание содержанию гуминовых кислот и растворенного органического вещества [8].

Авторы [9] указывают на высокую связь между содержанием ионов азота и фосфора и биомассой фитопланктона на участках рек, подверженных антропогенному воздействию. Согласно данным [11] для речных систем не всегда наблюдается корреляция между содержанием биогенных веществ и биомассой фитопланктона, тогда как для озер такая зависимость прослеживается более четко. При этом известно около 400 таксонов водорослей, которые способны отражать изменения содержания органического вещества в водной среде.

Авторы [12], отмечают значимость отношения содержания азота и фосфора, как самостоятельного абиотического фактора, ограничивающего рост водорослей и способного изменить структуру фитопланктонного сообщества.

Динамика фитопланктона в пресноводных экосистемах обуславливается его сложными связями с зоопланктоном и другими участниками пищевой цепочки, а также с многочисленными физическими и химическими факторами [1, 12, 13]. Интенсивность нарастания численности и биомассы фитопланктона зависит от интенсивности света и наличия питательных веществ, что, в свою очередь, зависит от притока питательных веществ извне [14] и внутренних процессов водоема [15]. Временные (межгодовые и сезонные) изменения факторов окружающей среды, прежде всего, колебания концентрации биогенных веществ в водной среде, усложняют понимание и интерпретацию этих взаимодействий, а также их воздействие на рост фитопланктона. Весной биогенных веществ достаточно и лимитирования, как правило, не наблюдают. В летний период, во время активного размножения фитопланктона, наступает период недостатка биогенных веществ [16].

Таким образом, целью исследования являлось изучение степени воздействия различных концентраций фосфат- и нитрат-ионов в питательной среде на динамику роста, а также флуоресценцию культуры микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали культуру микроводорослей *Chlorella sorokiniana*. Водоросли выращивали на стерильной культуральной среде Тамия, при пересеве в колбы Эрленмейера объемом 250 или 500 мл. Колбы освещали светодиодными лампами полного спектра A60 фирмы Uniell в течение 12 часов в сутки, периодически перемешивая. В ходе проведения исследований использовали импульсный флуориметр PhytoPAM фирмы Walz для определения концентрации хлорофилла в исследуемых пробах, а также для регистрации минимального и максимального уровня флуоресценции, и квантового выхода. Для регистрации кривых ИФХ использовали флуориметр ФС-2, разработанный на базе СКТБ «Турбулентность» и кафедры биофизики ДонНУ. На основании полученных кривых и параметров ОЛР-теста [3] проводили анализ состояния микроводорослей.

В ходе исследования проводили измерение общего содержания хлорофилла по сигналу флуоресценции на 470, 520, 645 и 685 нм, а также следующих показателей флуоресценции:

F_0 – минимальный уровень флуоресценции, соответствующий состоянию, когда все реакционные центры (РЦ) фотосистемы II (ФС II) открыты;

F_m – максимальный уровень флуоресценции, соответствующий состоянию, когда все РЦ ФС II закрыты;

$F_v = F_m - F_0$ – переменная или вариабельная флуоресценция, отражает соотношение между константами скоростей реакций фотохимического и не фотохимического использования энергии возбуждения реакционного центра;

$\Phi_0 = \frac{F_m - F_0}{F_m}$ – квантовый выход флуоресценции, показатель эффективности протекания первичной

фотохимической реакции в ФСII [3, 17, 18].

Подсчет числа клеток в пробах воды производили с помощью камеры Горяева под световым микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ограничение пищевых ресурсов, прежде всего, сказывается на численности популяции. В случае клеток фитопланктона, недостаток питательных веществ может приводить к изменению содержания фотопигментов, а также снижению фотосинтетической активности клеток.

Результаты измерений представлены в таблице 1.

Согласно полученным результатам между культурами, выращенными при содержании нитратов 0, 0,75 и 1,5 г/л, достоверных отличий не наблюдалось, тогда как для культуры с полным составом питательных веществ была характерна более высокая скорость роста численности. Разницу наблюдали через 7 дней культивирования. При этом выход на стадию плато для всех тест-культур наблюдали примерно в одинаковые промежутки времени – от 40 суток культивирования. Число клеток в пробах воды с наибольшим содержанием фосфатов на завершающем этапе эксперимента в 3 раза превышало значение для культуры, произрастающей в полном отсутствии фосфат-ионов (6 и 2 млн. клеток соответственно). При содержании фосфатов 1,25 г/л культура микроводорослей выходила на плато после 10 суток с начала эксперимента, тогда как другим культурам требовалось больше времени. Наблюдается четкая зависимость между содержанием биогена и численностью клеток – при снижении содержания фосфат-ионов скорость роста численности клеток снижается. Однако, на начальном этапе исследования в течение первых 7 дней рост численности был одинаков для всех культур.

Полное отсутствие фосфат-ионов в питательной среде приводит к снижению содержания хлорофилла в клетках микроводорослей после 20 дней культивирования. В случае полного состава питательной среды – 1,25 г/л $[PO_4]$ наблюдали рост содержания фотопигмента в пробах воды. Кроме того, при снижении содержания фосфатов (0,7 и 0,15 г/л) также наблюдали нарастание концентрации хлорофилла, но уже с меньшей скоростью, в сравнении с концентрацией 1,25 г/л. Для культур, выращенных при содержании нитратов 0, 0,75 и 1,5 г/л, достоверных отличий не наблюдалось. Культура, выращенная на среде Тамия с полным составом, характеризовалась наибольшей скоростью роста в сравнении с другими тест-культурами. Однако, стадии плато для изменения численности клеток такой же фазы роста для содержания хлорофилла не наблюдали. Возможно, рост концентрации хлорофилла связан с увеличением количества фотопигмента внутри уже функционирующих клеток, а не при появлении дочерних.

Не смотря на рост как числа клеток, так и содержания хлорофилла, наблюдали постепенное снижение квантового выхода флуоресценции. Стоит отметить, что интенсивному росту численности культур соответствовали высокие значения квантового выхода флуоресценции. Так, в первые 7 суток эксперимента квантовый выход составлял около 0,6-0,65 единиц. Со снижением скорости роста происходило и снижение квантового выхода до 0,5 ед. Через 20 суток культивации без добавления фосфатов квантовый выход клеток снижался и достигал своего минимума на 40-й день. Для культур, растущих в присутствии различных концентраций биогенных веществ, также было характерно снижение данного показателя, но до величины около 0,4 ед. При этом, для сред с содержанием 0,15 и 0,7 г/л фосфатов такое снижение можно объяснить истощением пищевого ресурса, то в случае с полным составом питательной среды такой эффект может быть вызван повышением плотности раствора, что, в свою очередь, приводило к «самозатенению» клеток фитопланктона. В результате такого эффекта большая часть клеток не получает достаточного количества световой энергии, что приводит к снижению эффективности функционирования фотосинтетического аппарата.

На следующем этапе исследования выполняли регистрацию световых кривых флуоресценции (RLC) клеток микроводорослей. Данный метод основан на постепенном повышении действующего света от самых низких интенсивностей до значений соизмеримых с актиничным светом с последующей регистрацией скорости электронного транспорта, квантового выхода, а также показателей минимальной и максимальной флуоресценции. Такие кривые позволяют оценить уровень адаптационных возможностей организмов к изменяющимся условиям освещенности, а также определить интенсивность протекания процессов нефотохимического тушения флуоресценции (тепловой диссипации и т.д.).

Таблица 1. Некоторые параметры культур клеток *Chlorella sorokiniana* при различном содержании нитрат- и фосфат-ионов в питательной среде

		NO ₃ , г/л				PO ₄ , г/л			
		0	0,75	1,5	2,5	0	0,15	0,7	1,25
7 сут.	N, млн. кл.	1,0±0,1	1,8±0,3	1,3±0,4	2,3±0,3	1,5±0,3	1,1±0,2	1,6±0,2	1,9±0,2
	Chl, мкг/л	57±5	54±1	70±2	119±4	86±2	47±2	71±5	106±2
	F ₀ , отн. ед.	967±70	1262±17	936±10	1122±12	726±18	706±8	776±7	768±15
	F _m , отн. ед.	3329±53	3536±23	3180±28	3718±24	2887±40	2389±5	2795±15	2876±62
	$\frac{F_v}{F_m}$, отн. ед.	0,554 ±0,010	0,538 0,007±	0,550 ±0,006	0,510 ±0,001	0,472 ±0,007	0,474 ±0,010	0,516 ±0,021	0,498 ±0,004
	ETR*, отн. ед.	51±6	49±7	59±4	66±4	68±3	64±4	58±7	70±3
	PI, отн. ед.	0,55 ±0,03	0,54 ±0,04	0,56 ±0,02	0,40 ±0,02	0,49 ±0,03	0,44 ±0,01	0,39 ±0,03	0,89 ±0,03
14 сут.	N, млн. кл.	2,1±0,3	2,1±0,4	1,9±0,4	3,2±0,4	2,3±0,4	1,4±0,5	2,0±0,2	3,0±0,3
	Chl, мкг/л	73±2	64±2	79±2	139±6	93±3	54±2	84±6	118±4
	F ₀ , отн. ед.	1257±37	1489±34	1843±44	2454±51	1138±61	1796 ±133	2031 ±153	2045 ±156
	F _m , отн. ед.	4162±85	5114±64	5634±31	7992±84	3453 ±100	5364 ±341	6218 ±516	7114 ±448
	$\frac{F_v}{F_m}$, отн. ед.	0,516 ±0,011	0,528 ±0,004	0,494 ±0,006	0,436 ±0,005	0,472 ±0,004	0,482 ±0,004	0,508 ±0,002	0,502 ±0,004
	ETR*, отн. ед.	66±3	73±5	78±3	84±4	85±2	71±3	70±4	89±3
	PI, отн. ед.	0,22 ±0,02	0,31 ±0,07	0,24 ±0,01	0,24 ±0,03	0,13 ±0,01	0,28 ±0,02	0,09 ±0,01	0,20 ±0,02
24 сут.	N, млн. кл.	2,4±0,2	2,6±0,2	2,0±0,3	4,2±0,4	1,8±0,1	1,6±0,2	2,0±0,2	4,1±0,3
	Chl, мкг/л	110±6	95±3	98±2	204±2	96±1	103±3	134±3	172±2
	F ₀ , отн. ед.	1777±46	1594±46	1749±36	2950±52	1877±21	2771±41	2784±49	3534 ±115
	F _m , отн. ед.	5164 ±117	4728 ±148	4992 ±129	8611 ±119	4162±31	7477 ±113	7667 ±129	8713 ±412
	$\frac{F_v}{F_m}$, отн. ед.	0,510 ±0,001	0,508 ±0,004	0,480 ±0,005	0,460 ±0,004	0,472 ±0,004	0,478 ±0,007	0,482 ±0,010	0,494 ±0,005
	ETR*, отн. ед.	51±7	50±8	54±5	61±4	56±6	60±3	59±5	57±3
	PI, отн. ед.	0,16 ±0,01	0,18 ±0,01	0,18 ±0,01	0,15 ±0,01	0,02 ±0,01	0,08 ±0,02	0,09 ±0,02	0,15 ±0,02
46 сут.	N, млн. кл.	3,4±0,2	3,7±0,3	3,8±0,2	5,8±0,4	2,1±0,2	3,3±0,3	4,2±0,4	5,7±0,4
	Chl, мкг/л	185±	194±5	204±7	367±3	19±2	220±8	249±3	291±4
	F ₀ , отн. ед.	2474±22	2591 ±103	2614±53	2683±45	3163±95	3010 ±205	3213±41	3991 ±146
	F _m , отн. ед.	5878±30	6025 ±148	5765 ±118	5837 ±110	7644 ±110	7430 ±323	7242 ±144	8626 ±142
	$\frac{F_v}{F_m}$, отн. ед.	0,442 ±0,004	0,428 ±0,004	0,438 ±0,004	0,388 ±0,007	0,352 ±0,010	0,392 ±0,004	0,396 ±0,005	0,420 ±0,006
	ETR*, отн. ед.	47±3	46±4	48±3	52±3	39±1	42±2	43±4	46±3
	PI, отн. ед.	0,08 ±0,01	0,06 ±0,01	0,05 ±0,01	0,04 ±0,01	0,02 ±0,01	0,05 ±0,01	0,04 ±0,01	0,05 ±0,02

Примечание. * – значения ETR представлены при максимальном PAR – 764 мкмоль фотон м⁻² с⁻¹

Каких-либо изменений общего вида кривых, свидетельствующих о нарушениях функционального состояния фотосинтетического аппарата не наблюдали. Кривые имели стандартный вид, но при этом отличались между собой в различные промежутки времени эксперимента.

На 14-сутки эксперимента наблюдали более высокие значения квантового выхода для клеток культуры с наибольшим содержанием биогенов в питательной среде. При этом значения квантового выхода для культуры, которая росла без добавления фосфатов были несколько выше, чем у культур с содержанием фосфат-ионов 0,7 и 0,15 г/л. Стоит отметить, что для всех исследуемых культур на данном этапе были характерны значения квантового выхода, полностью соответствующие норме. На 30-е сутки эксперимента общий вид кривой не изменился, но при этом происходило снижение значений квантового выхода. В условиях наименьшей освещенности (16 мкмоль фотон $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) значения квантового выхода не превышали 0,45 ед., что можно считать значением ниже нормы. Для культуры без фосфат-ионов наблюдали наименьшее значение данного показателя – 0,37 ед. при 16 мкмоль фотон $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

Показатели скорости электронного транспорта на 14-е сутки мало отличались для всех исследуемых культур. Различия проявлялись только при очень интенсивном свете, близком к насыщающему – от 564 до 764 мкмоль квант $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Наибольшая скорость электронного транспорта была характерна для культуры с минимальным содержанием биогенов в питательной среде. При этом в культуре с содержанием 0,75 г/л нитрат-ионов также наблюдали значения ETR выше, чем для культур, выращенных на питательных средах с содержанием 1,5 и 2,5 г/л. Форма световой кривой для ETR не изменялась. При этом с течением времени происходило снижение скорости электронного транспорта. Это наблюдалось для всех исследуемых культур.

Показатели скорости электронного транспорта при культивировании культур в присутствии различных концентрациях фосфат-ионов на 14-е сутки мало отличались для всех исследуемых культур. Различия проявлялись только при очень интенсивном свете, близком к насыщающему – от 564 до 764 мкмоль квант $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Наибольшая скорость электронного транспорта была характерна для культуры с содержанием фосфат-ионов в питательной среде 1,25 г/л. При этом в культуре с наиболее низким содержанием биогенов также наблюдали значения ETR выше, чем для культур, выращенных на питательных средах с содержанием 0,15 и 0,7 г/л. Однако, на последних этапах культивирования для культуры без фосфатов был характерен наиболее низкий показатель ETR. Наибольшие значения параметра сохранялись для культуры с наибольшим содержанием биогенов.

Согласно результатам ОЖР-теста большая часть исследуемых тест-функций не имела достоверных различий между отдельными экспериментальными культурами. Динамика изменения данных параметров в большей степени зависела от длительности культивации культуры. Для большинства параметров, отражающих скорость работы фотосинтетического аппарата и эффективность протекания фотосинтетических процессов в нем, было характерно постепенное снижение с течением времени. На начальных этапах эксперимента наблюдали резкое возрастание данных показателей – в период интенсивного нарастания тестовых культур.

В течение первых 7 суток культивации культур наблюдали резкое возрастание показателя функциональной активности фотосистемы II (PI), что согласуется с данными по нарастанию содержания хлорофилла и числа клеток в пробах воды. При этом для клеток с наименьшим содержанием биогенных веществ в питательной среде наблюдали наибольшие значения данного показателя. В течение последующих 10 дней наблюдали постепенное снижение параметра PI. Однако, при этом скорость снижения данного показателя была наименьшей для культуры с наибольшим содержанием биогенов в питательной среде. Поскольку данный показатель является интегральным и не зависит от числа клеток в исследуемом растворе, это указывает на более долгое сохранение фазы активного роста в культуре с содержанием фосфат-ионов 1,25 г/л. Прежде всего показатель PI – это показатель функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии. Следовательно, как только численность культуры микроводорослей возрастала до высоких концентраций, происходило снижение общего количества световой энергии, поглощаемого клетками фитопланктона. Это вызвано высокой плотностью исследуемых растворов. На заключительном этапе исследования наблюдали наиболее низкие значения параметра PI, которые не изменялись с течением времени.

Таким образом, при недостатке нитрат- и фосфат-ионов в питательной среде происходят изменения в функционировании фотосинтетического аппарата микроводорослей: возрастание скорости закрывания реакционных центров ФС II, а также резкого возрастания и последующего снижения фотосинтетического индекса эффективности функционирования ФС II.

Согласно литературным данным, при неблагоприятном воздействии на клетки фитопланктона в начальные моменты времени наблюдают возрастание показателей флуоресценции, в частности квантового выхода и энергетических параметров [17–20]. Низкие показатели PI на последующих этапах измерений свидетельствуют о низкой фотосинтетической активности клеток, что соотносится с динамикой изменения численности клеток фитопланктона, а также содержанием фотосинтетических пигментов в пробах воды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Низкое содержание биогенов способствует снижению скорости роста численности культуры *Chlorella sorokiniana*, снижению скорости нарастания содержания хлорофилла в исследуемых пробах.

Недостаток биогенных веществ приводит к нарушению адаптационных свойств фотосинтетического аппарата микроводорослей при действии света невысокой интенсивности (около 264 мкмоль квант $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), а также уменьшению скорости электронного транспорта при культивировании клеток более 14 дней.

При недостатке фосфат- и нитрат-ионов в питательной среде происходит снижение эффективности переработки поглощенной световой энергии клетками фитопланктона и фотосинтетического индекса эффективности функционирования ФС II.

Список литературы / References:

1. Филенко О.Ф., Михеева И.В. *Основы водной токсикологии*. М.: Колос, 2007, 144 с. [Filenko O.F., Mikheeva I.V. *Basics of water toxicology*. M.: Kolos, 2007, 144 p. (In Russ.)]
2. Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, vol. 990, pp. 87-92. DOI: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9.
3. Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation*. Ed. Mohanty, Yunus and Parthre. London: Taylor & Francis, 1998, pp.1-59.
4. Абакумов А.И., Пак С.Я., Симонов А.Я. *Модель минерального питания фитопланктона*. Владивосток, 2011, 126 с. [Abakumov A.I., Pak S.Ya., Simonov A.Ya. *Phytoplankton mineral nutrition model*. Vladivostok, 2011, 126 p. (In Russ.)]
5. Степанова И.Э., Бикбулатова Е.М. Значимость соотношений форм биогенных элементов для оценки современного состояния Рыбинского водохранилища. *Поволжский экологический журнал*, 2015, № 3, с. 330-337. [Stepanova I.E., Bikbulatova E.M. The significance of the ratios of the forms of nutrients for assessing the current state of the Rybinsk reservoir. *Povolzhskiy ekologicheskiy zhurnal*, 2015, no. 3, pp. 330-337 (In Russ.)]
6. Smith V.H. The nitrogen and phosphorus dependence of algal biomass in lakes: an empirical and theoretical analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 1982, vol. 23, pp. 1248-1255. DOI: 10.4319/lo.1982.27.6.1101.
7. Шаров А.Н. *Фитопланктон водоемов Кольского полуострова*. Петрозаводск, 2004, 99 с. [Sharov A.N. *Phytoplankton of the Kola Peninsula*. Petrozavodsk, 2004, 99 p. (In Russ.)]
8. Клоченко П.Д., Медведь В.А., Васильчук Т.А., Василенко О.В. Особенности влияния гуминовых кислот на развитие планктонных водорослей. *Гидробиологический журнал*, 2010, т. 46, № 5, с. 102-110 [Klochenko P.D., Medved V.A., Vasilchuk T.A., Vasilenko O.V. Features of the influence of humic acids on the development of planktonic algae. *Gidrobiologicheskij jurnal*, 2010, vol. 46, no. 5, pp. 102-110. (In Russ.)]
9. Суходольская И.Л., Мантурова О.В., Грюк И.Б. Фитопланктон малых рек Ровенской области (Украина) и связь его количественных показателей с содержанием биогенных элементов. *Гидробиологический журнал*, 2015, т. 51, № 3, с. 56-68. [Sukhodolskaya I.L., Manturova O.V., Gryuk I.B. Phytoplankton of small rivers in the Rivne region (Ukraine) and the relationship of its quantitative indicators with the content of nutrients. *Gidrobiologicheskij jurnal*, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 56-68. (In Russ.)]
10. Трифонова И.С., Расплетина Г.Ф., Павлова О.А. Органическое вещество, биогенные элементы и фитопланктон в оценке состояния рек бассейна Ладожского озера. *Органическое вещество и биогенные элементы во внутренних водоемах и морских водах*. Материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием. 10-14 сентября 2012 г., г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2012, с. 66-70. [Trifonova I.S., Raspletina G.F., Pavlova O.A. Organic matter, nutrients and phytoplankton in assessing the condition of the rivers of Lake Ladoga basin. *Organicheskoe veschestvo i biogennyye elementy vo vnutrennih vodoemah i morskikh vodah*. Materialy V Vserossiyskogo simpoziuma s mezhdunarodnyim uchastiem. 10-14 sentyabrya 2012, Petrozavodsk, Respublika Kareliya, Rossiya. Petrozavodsk: Karelskiy nauchnyy tsentr RAN, 2012, pp. 66-70. (In Russ.)]
11. Булгаков Н.Г., Левич А.П. Биогенные элементы в среде и фитопланктон: соотношение азота и фосфора как самостоятельный фактор регуляции структуры альгоценоза. *Успехи современной биологии*, 1995, т. 115, вып. 1, с. 13-23. [Bulgakov N.G., Levich A.P. Biogenic elements in the environment and phytoplankton: the ratio of nitrogen and phosphorus as an independent factor in the regulation of the structure of algocenosis. *Uspehi sovremenoy biologii*, 1995, vol. 115, iss. 1, pp. 13-23. (In Russ.)]
12. Филенко О.Ф. *Методы биотестирования качества водной среды*. М.: Изд. МГУ, 1989, 178 с. [Filenko O.F. *Methods of biotesting the quality of the aquatic environment*. M.: Izd. MGU, 1989, 178 p. (In Russ.)]
13. Istvanovics V. Continuous monitoring of phytoplankton dynamics in Lake Balaton (Hungary) using on-line delayed fluorescence excitation spectroscopy // *Freshwater Biology*, 2005, no. 50, pp. 1950-1970. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2005.01442.x.
14. Goldman C.R., Jassby A., Powell T. Interannual fluctuations in primary production: Meteorological forcing at two subalpine lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 1989, no. 34, pp. 310-323. DOI: 10.4319/lo.1989.34.2.0310.
15. Sterner R.W. Herbivores direct and indirect effects on algal populations. *Science*, 1986, no. 231, pp. 605-607. DOI: 10.1126/science.231.4738.605.
16. Гончаров А.В., Абдуллаева К.М. Особенности фитопланктона Москворецких водохранилищ в связи с их глубоководностью и изменением уровня воды. *Ученые записки Российского государственного гидрометеорологического университета*, 2014, № 34, с. 128-134. [Goncharov A.V., Abdullaeva K.M. Features of phytoplankton of Moskvoretsky reservoirs in connection with their deep water and changes in water level. *Uchenye zapiski Rosiyskogo gosudarstvennogo gidrometeorologicheskogo universiteta*, 2014, no. 34, pp. 128-134. (In Russ.)]
17. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллахвердиев С.И. *Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а — теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений*.

М. Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014, 220 с. [Goltsev V.N., Kalaji M.Kh., Kuzmanova M.A., Allahverdiyev S.I. *Variable and delayed fluorescence of chlorophyll a - theoretical foundations and practical application in plant research*. М. Izhevsk: Institut kompyuternykh issledovaniy, 2014, 220 p. (In Russ.)]

18. Корнеев Д.Ю. *Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла*. К.: Альтерпрес, 2002, 188 с. [Korneev D.Yu. *Information possibilities of chlorophyll fluorescence induction method*. К.: Alterpres, 2002, 188 p. (In Russ.)]

19. Лысенко В.С., Вардуни Т.В., Соьер В.Г., Краснов В.П. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода. *Фундаментальные исследования*, 2013, № 4-1, с. 112-120. [Lysenko V.S., Varduni T.V., Sawyer V.G., Krasnov V.P. Plant chlorophyll fluorescence as an indicator of environmental stress: theoretical basis for the application of the method. *Fundamentalnye issledovaniya*, 2013, no. 4-1, pp. 112-120. (In Russ.)]

20. Butler W.L. *Chlorophyll fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer*. In: Encyclopedia of Plant Physiology, ed. by Trebst A., Avron M. Springer. Berlin, 1977, vol. 5, pp. 149-167. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.001525.

FLUORESCENCE PARAMETERS AND *CHLORELLA SOROKINIANA* CULTURE GROWTH DYNAMICS AT DIFFERENT CONTENT OF BIOGENIC SUBSTANCES

Bespalova S.V., Romanchuk S.M., Chufitskiy S.V.

Donetsk State University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283001, DPR; e-mail: ChufitskiySergey@yandex.ru

Abstract. The effect of various concentrations of nutrients on the growth dynamics of the microalgae *Chlorella sorokiniana*, as well as on the content of chlorophyll and the fluorescence of the cells of the culture is considered. Using the method of fluorimetry, the photosynthetic activity of culture cells was evaluated. It was shown that a low content of nitrates and phosphates leads to a decrease in the growth rate of the culture, a decrease in the concentration of chlorophyll in water samples, and also to a decrease in the speed of electron transport at the level of photosystem II, quantum yield, and basic fluorescence indices. The photosynthetic efficiency index (PI) of the functioning of photosystem II was evaluated. It was shown that the PI index increases with an intensive increase in the biomass of *Chlorella sorokiniana*, and decreases with a decrease in the growth rate of the culture.

Key words: *fluorescence, phytoplankton, nitrates, phosphates, chlorophyll.*

БИОИНДИКАЦИОННАЯ ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПРИБРЕЖНЫХ АКВАТОРИЙ Г. СЕВАСТОПОЛЯ

Скуратовская Е.Н.¹, Дорошенко Ю.В.¹, Алёмова А.С.², Ковалева М.А.¹

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

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: skuratovskaya2007@rambler.ru

² Воронежский государственный университет

Университетская площадь, 1, г. Воронеж, 394018, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2020

Аннотация. Активная эксплуатация прибрежных районов в комплексе с техногенным загрязнением неизбежно приводит к истощению биологических ресурсов и ухудшению их состояния. Одним из таких районов является акватория г. Севастополя, которая служит коллектором различных загрязнителей. В связи с этим контроль загрязнения водной среды и состояния биоты севастопольских бухт остаются основными задачами регионального экологического мониторинга с применением методов биоиндикации. Методы микробной индикации дают возможность выявлять и контролировать появление загрязняющих веществ в воде гораздо раньше, чем происходят необратимые токсические эффекты у гидробионтов. Мидии часто используются в качестве биоиндикаторов загрязнённости морской воды благодаря значительной аккумуляции загрязняющих веществ в их организме при относительно низкой концентрации поллютантов в среде. В работе проведена оценка экологического состояния прибрежных акваторий г. Севастополя по результатам микробиологического мониторинга донных отложений (общее количество гетеротрофов и численность углеводородокисляющих бактерий) и параметрам прооксидантно-антиоксидантной системы (уровень окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов, активность супероксиддисмутазы и каталазы) гепатопанкреаса мидии *Mytilus galloprovincialis*. Исследования проводили в трех севастопольских бухтах с разным уровнем загрязнения летом 2019 г.: Ласпи, Казачьей, Стрелецкой. Максимальные значения численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов обнаружены в грунтах б. Стрелецкой, минимальные – в донных отложениях б. Ласпи. Отмечено достоверное увеличение параметров прооксидантно-антиоксидантной системы в гепатопанкреасе мидий из бухты Стрелецкой по сравнению с соответствующими показателями экземпляров из б. Казачьей и б. Ласпи. Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне загрязнения и менее благоприятных условиях обитания гидробионтов в акватории б. Стрелецкой. Исследованные показатели можно использовать в экологическом мониторинге прибрежных акваторий г. Севастополя для оценки состояния гидробионтов и среды их обитания.

Ключевые слова: биоиндикаторы, мидии, гетеротрофные бактерии, углеводородокисляющие бактерии, биомаркеры, прооксидантно-антиоксидантная система, Чёрное море.

В настоящее время проблема хронического загрязнения морских прибрежных акваторий привлекает всё большее внимание исследователей и общественности. Активная эксплуатация прибрежных районов в комплексе с техногенным загрязнением неизбежно приводит к истощению биологических ресурсов и ухудшению их состояния. В результате хозяйственной деятельности человека в море попадают сточные воды, содержащие отходы производства и коммунального хозяйства, сливы с сельскохозяйственных угодий и морского транспорта. Все это приводит к аккумуляции токсических веществ в донных отложениях, изменению физико-химических свойств воды и грунтов, что негативно влияет на биоту. Одним из таких районов является акватория г. Севастополя, которая служит коллектором различных загрязнителей. В её водные массы поступают неочищенные или условно-чистые промышленные и хозяйственно-бытовые сточные воды. Как следствие, в прибрежных районах сформировались зоны с высокими концентрациями токсикантов в донных осадках: тяжёлых металлов, хлор- и фосфорорганических соединений, нефтяных углеводородов, радионуклидов. Поллютанты поглощаются и накапливаются гидробионтами, вызывая реорганизацию обменных процессов, интоксикацию [1-4].

В связи со сложившейся ситуацией контроль загрязнения водной среды и биоты остаются основными задачами экологического мониторинга. Однако применяемые в настоящее время методы физико-химического анализа не позволяют оценить состояние морских прибрежных экосистем, так как отражают ситуацию непосредственно в период взятия проб и не позволяют определять все известные и искать неизвестные виды загрязнителей водной среды. Поэтому в настоящее время для комплексной оценки экологического состояния прибрежных акваторий, наряду с традиционными физико-химическими методами, широко применяются методы биоиндикации, наиболее полно отражающие качество окружающей природной среды и реакцию гидробионтов на весь комплекс негативного влияния среды в целом. Применение данного подхода требует подбора биоиндикаторных видов и информативных показателей (биомаркеров), по которым можно оценить степень нарушения биологических функций гидробионтов в условиях многофакторного антропогенного прессинга [4-7].

Микроорганизмы благодаря высокой экологической пластичности, обусловленной уникальными физиолого-биохимическими и генетическими особенностями, быстро реагируют на изменение качества среды и действие стрессовых факторов и могут служить индикаторами загрязнения морских акваторий. Методы микробной индикации дают возможность выявлять и контролировать появление загрязняющих веществ в воде гораздо раньше, чем происходят необратимые токсические эффекты у гидробионтов. По показателям численности микроорганизмов можно судить о степени загрязнения водной среды [8]. В то же время, донные беспозвоночные и их сообщества являются чувствительными индикаторами загрязнения водных объектов. Структурные и функциональные характеристики зообентоса являются перспективным элементом системы мониторинга загрязнения водной среды [5]. Бентосные организмы в наибольшей степени подвержены влиянию химического загрязнения, так как они обитают непосредственно в придонной части, где оседают и накапливаются различные токсиканты. В объектах питания бентосных организмов содержание токсических веществ повышено вследствие их поступления из придонных слоёв воды и грунта. Доминирующим видом в сообществах макрозообентоса севаستопольских бухт является мидия *Mytilus galloprovincialis*. Благодаря значительной аккумуляции загрязняющих веществ в организме при относительно низкой их концентрации в морской воде, мидии часто используются в качестве биоиндикаторов загрязнённости морской воды тяжелыми металлами, нефтяными углеводородами, пестицидами [9-11].

Для обнаружения самых ранних «сигнальных» изменений в метаболизме водных организмов используют молекулярные биомаркеры, позволяющие выявить механизмы воздействия комплекса негативных факторов среды на конкретные звенья метаболизма, определить основную стратегию и особенности структурно-функциональных изменений в организме при адаптации к неблагоприятным условиям обитания. В качестве таких биомаркеров широко используют параметры прооксидантно-антиоксидантной системы (ПАС) [4,6,7,12].

Цель работы – оценка экологического состояния прибрежных акваторий г. Севастополя по результатам микробиологического мониторинга донных отложений и параметрам прооксидантно-антиоксидантной системы гепатопанкреаса мидии *Mytilus galloprovincialis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 3-х севастопольских бухтах с разным уровнем загрязнения летом 2019 г. - Ласпи, Казачьей, Стрелецкой (рис. 1).

Характеристика районов исследований. Стрелецкая бухта является одной из наиболее подверженных антропогенному прессу акваторий г. Севастополя. Вдоль восточного побережья базируются корабли Черноморского флота. Западное побережье занято городскими жилыми застройками. В последние десятилетия наблюдается изменение «качества» антропогенной нагрузки в данной акватории, в частности за счёт интенсивной застройки береговой полосы коммунальными и гостинично-туристическими комплексами, расширения сети причалов для судов малого (прогулочного) флота [2,13]. Для осадков Стрелецкой бухты характерны заиленные ракушняки, пески и чёрные илы. Рыхлые грунты б. Стрелецкой представлены в основном алевроито-пелитовыми фракциями, обладающими наибольшей аккумулирующей способностью, в связи с чем бухта характеризуется высоким загрязнением донных осадков хлорорганическими соединениями и нефтяными углеводородами [1,2].

Б. Казачья расположена в 15 км от центра города и является одной из наиболее чистых в системе севастопольских бухт. Донные отложения Казачьей бухты представлены в основном заиленными ракушняками и песками. Такие крупнозернистые осадки характеризуются хорошей промываемостью и малой сорбционной ёмкостью загрязняющих веществ [14].

Бухта Ласпи является большой открытой бухтой, расположенной на Южном берегу Крыма. Оценка динамической активности вод показывает, что процесс водообмена в районе бухты Ласпи происходит довольно интенсивно, что свидетельствует о благополучном экологическом состоянии акватории [15]. В б. Ласпи донные отложения представлены в основном песками, слабо сорбирующими гидрофобные загрязняющие вещества.

Концентрация хлорорганических загрязнителей и нефтяных углеводородов здесь намного ниже, чем в других исследуемых районах [1].



Рисунок 1. Районы исследований: 1 – б. Стрелецкая, 2 – б. Казачья, 3 – б. Ласпи

Таким образом, уровень загрязнения тестируемых бухт существенно различается, что особенно выражено для грунтов, с которыми тесно контактируют объекты исследований.

Микробиологический анализ. Для микробиологического анализа отбирали пробы донных осадков. После доставки в лабораторию вся последующая обработка проб проводилась в стерильных условиях. Численность углеводородокисляющих бактерий (УОБ) и общее количество гетеротрофов определяли методом предельных разведений на соответствующих селективных питательных средах. Для исследования общего количества гетеротрофов использовали пептонную воду, для определения численности УОБ – среду Диановой-Ворошиловой с добавлением дизельного топлива. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объема рассчитывали по таблице Мак–Креди, разработанной на основании методов вариационной статистики [16].

Биохимический анализ. В бухтах отбирали одноразмерных мидий (со средней длиной 50 мм), проводили их полный биологический анализ. Для биохимического анализа использовали гепатопанкреас. Образцы тканей несколько раз промывали холодным 0.85% физ. раствором, гомогенизировали, центрифугировали при 8000 g 15 минут. Для дальнейшего анализа использовали супернатант. В качестве параметров ПАС в супернатанте анализировали активность ключевых антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), показатели окислительного стресса – содержание ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП), отражающих уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), и уровень окислительной модификации белков (ОМБ). Активность СОД определяли в системе нитросиний тетразолиевый – феназинметасульфат – никотиамиддинуклеотид [17], активность каталазы (КАТ) – по реакции взаимодействия перекиси водорода с молибдатом аммония [18], содержание ТБК-реактивных продуктов – по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой [19]. Уровень ОМБ анализировали на основе реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белка с 2,4-динитрофенилгидразином [20]. Оптическую плотность образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали при следующих длинах волн: 346 нм и 370 нм (альдегидные (D346) и кетонные (D370) продукты окислительной модификации нейтрального характера), а также при 430 нм и 530 нм (альдегидные (D430) и кетонные (D530) продукты окислительной модификации основного характера). Все определения проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Биохимические показатели пересчитывали на 1 мг белка сырой массы ткани, концентрацию которого определяли с использованием стандартного набора реагентов “ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ” (Россия). Результаты биохимического анализа обрабатывали статистически, вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку средней. Достоверность различий между выборками оценивали с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели ПАС системы гепатопанкреаса *Mytilus galloprovincialis* представлены в таблице 1.

Активность СОД, КАТ, содержание ТБКРП в гепатопанкреасе мидий из б. Стрелецкой значительно превышали значения особей из б. Казачьей и б. Ласпи ($p < 0.05$). Уровень ОМБ был достоверно выше у моллюсков из б. Стрелецкой по сравнению с таковым у особей из б. Ласпи (при всех длинах волн) и б. Казачьей (при $\lambda = 370$) ($p < 0.05$). В то же время, показатели СОД, ТБКРП и содержание кетонных (D530) продуктов ОМБ основного характера у экземпляров из б. Казачьей были выше, чем в б. Ласпи ($p < 0.05$).

Значения численности гетеротрофов в б. Ласпи составили 2500 кл./г, б. Казачьей - 25000 кл./г, б. Стрелецкой - 95000 кл./г. Максимальное количество углеводородокисляющих микроорганизмов отмечено в б. Стрелецкой 250 кл./г. Для б. Казачьей численность УОБ составила 45 кл./г. В б. Ласпи обнаружены лишь следовые значения - 1,5 кл./г (рис. 2).

Таблица 1. Параметры прооксидантно-антиоксидантной системы в гепатопанкреасе мидии *Mytilus galloprovincialis* из трех бухт города Севастополя

Параметр	Б. Ласпи (n=15)	Б. Казачья (n=15)	Б. Стрелецкая (n=15)
СОД, ед. опт. плот./мг бел./мин	4,25±1,04	12,27±2,42*	22,06±0,46*. **
КАТ, мкат/мг бел.	0,185±0,03	0,176±0,07	0,326±0,06*. **
ТБКРП, нмоль/мг бел.	2,92±0,42	4,84±0,35*	6,47±0,7*. **
D356, ед. опт. плот./мг бел.	0,053±0,004	0,059±0,006	0,069±0,006*
D370, ед. опт. плот./мг бел.	0,057±0,006	0,058±0,008	0,087±0,01*. **
D430, ед. опт. плот./мг бел.	0,031±0,004	0,038±0,005	0,052±0,006*
D530, ед. опт. плот./мг бел.	0,006±0,002	0,012±0,003*	0,014±0,004*

Примечание: * - различия достоверны по сравнению со значениями мидий из б. Ласпи, ** - то же из б. Казачьей.

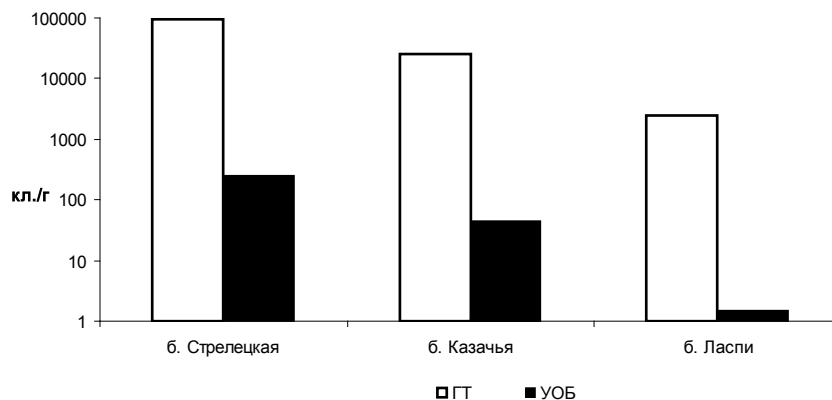


Рисунок 2. Численность общего количества гетеротрофов (ГТ) и углеводородокисляющих бактерий (УОБ) в донных отложениях

ОБСУЖДЕНИЕ

Загрязнение водной среды вызывает нарушения процессов жизнедеятельности гидробионтов. Индикаторами этих изменений могут служить микроорганизмы. В решении проблемы загрязнения природных вод все большее внимание уделяется биологическим методам микробной индикации, основанным на способности микроорганизмов использовать в качестве единственного источника углерода специфические органические соединения, а также выживать и размножаться в среде, содержащей высокие концентрации загрязняющих токсических веществ. Численность углеводородокисляющих микроорганизмов служит индикатором нефтяного загрязнения, тогда как общее количество гетеротрофов - индикатором наличия легко доступного органического вещества [3,8]. На основании результатов микробиологического анализа грунтов донные осадки исследуемых бухт можно расположить в следующей последовательности по уровню загрязнения: б. Ласпи → б. Казачья → б. Стрелецкая. Полученные результаты согласуются с литературными данными по содержанию нефтяных углеводородов (НУ) и хлороформ-экстрагируемых веществ (ХЭВ) в донных отложениях исследуемых районов. Так, максимальные концентрации НУ отмечены в донных осадках б. Стрелецкой – от 105 до 700 мг/100 г. В б. Казачьей содержание НУ составило 60 мг/100 г. В б. Ласпи установлены минимальные значения – 9 мг/100 г. Содержание ХЭВ в б. Ласпи составляло 37 мг/100 г, б. Казачьей – 23,4 мг/100 г, б. Стрелецкой – от 200 до 1560 мг/100 г [2,14,21].

Учитывая ключевую роль свободнорадикальных процессов в механизмах токсичности широкого спектра загрязнителей, для биоиндикационной оценки качества водной среды широко применяют показатели ПАС. ПАС включает генерацию активных форм кислорода (АФК), инициирующих свободнорадикальные процессы, и антиоксидантную защиту посредством низкомолекулярных соединений и ферментов, функции которых заключаются в восстановлении продуктов перекисного окисления и поддержании концентрации АФК на низком, оптимальном для организма уровне. Баланс процессов свободнорадикального окисления (СРО) и антиоксидантной защиты отражает адаптационные возможности и позволяет оценить ответные реакции организмов на неблагоприятные условия среды, а его смещение приводит к патологическим изменениям, повреждению молекулярных и клеточных структур, развитию окислительного стресса [4,12,22]. Универсальным показателем окислительного стресса при действии отдельных токсикантов и комплексном загрязнении акваторий является увеличение в тканях гидробионтов содержания продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков [4,23,24]. Обнаруженное в наших исследованиях повышение содержания ТБКРП и уровня ОМБ в гепатопанкреасе мидий из б. Стрелецкой может указывать на усиление свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса (табл. 1). В то же время, увеличение активности ключевых антиоксидантных ферментов СОД и КАТ на фоне повышения содержания окисленных форм белков и липидов может свидетельствовать о компенсаторном характере адаптивной ответной реакции на загрязнение, направленной на снижение интенсивности СРО. Сходные ответные реакции ПАС были отмечены в тканях гидробионтов разных систематических групп в условиях высокого загрязнения водной среды [4,7,24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сравнительный анализ микробиологических показателей грунтов и биохимических параметров мидий из тестируемых акваторий г. Севастополя позволил выявить определённые отличия и характеризовать экологическое состояние районов исследования. Максимальные значения численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов обнаружены в грунтах б. Стрелецкой, минимальные – в донных отложениях б. Ласпи. Отмечено достоверное увеличение параметров ПАС - содержания продуктов ОМБ, ПОЛ, активности СОД и КАТ в гепатопанкреасе мидий из бухты Стрелецкой по сравнению с соответствующими показателями экземпляров из б. Казачьей и б. Ласпи. Полученные результаты свидетельствует о высоком уровне загрязнения и менее благоприятных условиях обитания гидробионтов в

акватории б. Стрелецкой. Исследованные показатели можно использовать в экологическом мониторинге прибрежных акваторий г. Севастополя для оценки состояния гидробионтов и среды их обитания.

Работа выполнена в рамках тем Государственного задания ФИЦ ИнБЮМ № АААА-А18-118020890074-2, № АААА-А18-118020890090-2, при поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18-34-50005 («Наставник»).

Список литературы / References:

1. Малахова Л.В., Скуратовская Е.Н., Малахова Т.В., Болтачев А.Р., Лобко В.В. Хлороорганические соединения в ерше *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в акватории Севастополя (Чёрное море): пространственное распределение и биологический отклик на уровень накопления загрязнителей. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 4, с. 51-63. [Malakhova L.V., Skuratovskaya E.N., Malakhova T.V., Boltachev A.R., Lobko V.V. Organochlorine compounds in scorpion fish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 in the Sevastopol marine area (The Black sea): spatial distribution and biological response. *Marine Biological Journal*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 51-63. DOI: 10.21072/mbj.2018.03.4.06. (In Russ.)]
2. Тихонова Е.А., Котельянец Е.А., Волков Н.Г. Характеристика загрязнения донных отложений прибрежной акватории Севастополя на примере Стрелецкой бухты (Черное море). *Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря*, 2018, № 1, с. 74-80. [Tikhonova E.A., Kotelyanets E.A., Volkov N.V. Characteristic of pollution of the bottom deposits in the coastal area of Sevastopol on the example of the Streletskaia bay (The Black sea) *Ecological safety of coastal and shelf zones of sea*, 2018, no. 1, pp. 74-80. DOI: 10.22449/2413-5577-2018-1-74-80. (In Russ.)]
3. Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века. Под ред.: О.Г. Миронова, С.В. Алёмова; Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН. Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018, 276 с. [Sanitary and biological studies of the south-western Crimea coastal waters at the beginning of XXI century. Eds: O.G. Mironov, S.V. Alyomov. Simferopol.: Arial, 2018, 276 p. (In Russ.)]
4. Rudneva I.I., Skuratovskaya E.N., Chesnokova I. I., Shaïda V.G., Kovyrshina T.B. Biomarker response of Black Sea scorpion fish *Scorpaena porcus* to anthropogenic impact. *Advances in Marine Biology*. A. Kovács, P. Nagy (Eds). New York: Nova Sci. Publs, 2016, ch. 5, vol. 1, pp. 119-147.
5. Безматерных Д.М. Зообентос как индикатор экологического состояния водных экосистем Западной Сибири: аналит. обзор. Гос. публич. науч.-техн. б-ка Сиб. отд-ния Рос. акад. наук, Ин-т вод. и экол. проблем. Новосибирск, 2007, 87 с. (Сер. Экология. Вып. 85). [Bezmaternykh D.M. Zoobentos as an indicator of water ecosystems state in Western Siberia Novosibirsk, 2007, 87 p. (In Russ.)]
6. Немова Н.Н., Мещерякова О.В., Лысенко Л.А., Фокина Н.Н. Оценка состояния водных организмов по биохимическому статусу. *Труды КарНЦ*, 2014, № 5, с. 18-29. [Nemova N.N., Mecheryakova O.V., Lysenko L.A., Fokina N.N. Assessment of the state of aquatic organisms by their biochemical status. *Transactions of KarRC RAS*, 2014, no. 5, pp. 18-29. (In Russ.)]
7. Лукьянова О.Н., Корчагин В.П. Интегральный биохимический индекс состояния водных организмов в условиях загрязнения. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*, 2017, № 2, с. 174-180. [Lukyanova O.N., Korchagin V.P. Integral biochemical index of the state of aquatic organisms under pollution conditions. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences*, 2017, no. 2, pp. 174-180. (In Russ.)]
8. Каретникова Е.А., Гаретова Л.А. Бактериопланктон и бактериобентос Амурского лимана и прилегающих акваторий летом 2006 г. *Океанология*, 2009, т. 49, № 3, с. 409-417. [Karetnikova E.A., Garetova L.A. Bacterioplankton and bacteriobentos of the Amur estuary and adjacent water areas in the summer of 2006. *Oceanology*, 2009, vol. 49, no. 3, pp. 409-417. (In Russ.)]
9. Макаров М.В., Бондаренко Л.В., Витер Т.В., Подзорова Д.В. Обрастания твердых искусственных субстратов в сезонном аспекте у побережья Севастополя (Юго-Западный Крым, Черное море). *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*, 2019, т. 5 (71), № 2, с. 116-131. [Makarov M.V., Bondarenko L.V., Viter T.V., Podzorova D.V. Fouling of solid artificial substrates in a seasonal aspect off the coast of Sevastopol (South-Western Crimea, the Black Sea). *Uchenyye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya*, 2019, vol. 5 (71), no. 2, pp. 116-131. (In Russ.)]
10. Миронов О.Г. Мидии как элемент гидробиологической очистки загрязненных морских вод. *Водные ресурсы*, 1988, № 5, с. 104-111. [Mironov O.G. Mussels as an element of the hydrobiological treatment of polluted sea waters. *Vodnyye resursy*, 1988, no. 5, pp. 104-111. (In Russ.)]
11. Узбекова О.Р., Луценко Е.С. Изучение активности мидий *Mytilus edulis* литорали Кольского залива по микробиологическим показателям. *Успехи современного естествознания*, 2011, № 8, с. 73-75. [Uzbekova O.R., Lutsenko E.S. Study of the activity of mussels *Mytilus edulis* littoral of the Gulf of Kola according to microbiological indicators. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya*, 2011, no. 8, pp. 73-75. (In Russ.)]
12. Kroon F., Streten C., Harries S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS ONE*, 2017, vol. 2, no. 4, p. e0174762. DOI: 10.1371/journal.pone.0174762.
13. Осадчая Т.С. Нефтяные углеводороды в донных осадках прибрежных акваторий г. Севастополя (Чёрное море). *Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development 2013*. (дата обращения

- 09.07.2020) [Osadchaya T.S. Oil hydrocarbons in bottom sediments of Sevastopol coastal areas (the Black Sea). *Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development 2013*. (In Russ.)]
14. Соловьёва О.В., Тихонова Е.А., Клименко Т.Л., Скрыпник Г.В., Вотинова Т.В. Органические вещества донных отложений в условиях урбанизации побережья (на примере бухты Казачьей, Черное море). *Океанология*, 2019, т. 59, № 2, с. 234-242. [Soloveva O.V., Tikhonova E.A., Klimenko T.L., Skrupnik G.V., Votnova T.V. Organic Substances of Sea Bottom Sediments in Conditions of the Coast Urbanization (for Example Kazachiya Bay, the Black Sea) *Oceanology*, 2019, т. 59, no. 2, pp. 234-242. (In Russ.)]
15. Ациховская Ж.М., Чекменёва Н.И. Оценка динамической активности вод района бухты Ласпи (Черное море). *Экология моря*, 2002, т. 59, с. 5-8. [Atsikhovskaya Zh.M., Chekmeneva N.I. Assessment of the dynamic activity of the waters of the Laspi Bay area (Black Sea). *Ekologiya morya*, 2002, vol. 59, pp. 5-8.
16. Лысак В.В. *Микробиология*. Минск: БГУ, 2005, 364 с. [Lysak V.V. *Mikrobiology*. Minsk.: BGU, 2005, 364 p. (In Russ.)]
17. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochim. Biophys. Res. Commun*, 1972, vol. 46, no. 2, pp. 849-854.
18. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoye delo*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
19. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*. Москва: Медицина, 1977, с. 66-68. [Stal'naya I.D., Garishvili T.G. Method for determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry*. Moskva: Meditsina, 1977, pp. 66-68. (In Russ.)]
20. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения. *Вопросы медицинской химии*, 1995, т. 41, № 1, с. 24-26. [Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. Oxidative modification of human serum proteins, method for its determination. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 1995, vol. 41, no. 1, pp. 24-26. (In Russ.)]
21. Тихонова Е.А., Котельянец Е.А., Соловьёва О.В. Оценка уровня загрязнения донных отложений крымского побережья Черного и Азовского морей. *Принципы экологии*, 2016, № 5 (21), с. 56-70. [Tikhonova E.A., Kotelyanets E.A., Soloveva O.V. Assessment of the level of pollution of bottom sediments of the Crimean coast of the Black and Azov Seas. *Printsipy ekologii*, 2016, no. 5 (21), pp. 56-70. (In Russ.)]
22. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*. М.: Фирма «Слово», 2006, 556 с. [Menshchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A. *Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants*. M.: Firma "Slovo", 2006, 556 p. (In Russ.)]
23. Stoliar O.B., Lushchak V.I. *Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. In Oxidative Stress – Environmental Induction and Dietary Antioxidants* / Ed. V. Lushchak, 2012, p. 131-166.
24. Kovyrshina T.B., Rudneva I.I. The effects of coastal water pollution of the Black Sea on the blood biomarkers of the round goby *Neogobius melanostomus* Pallas, 1811 (Perciformes: Gobiidae). *Russian Journal of Marine Biology*, 2016, vol. 42 (1), pp. 58-64.

BIOINDICATION ASSESSMENT OF THE ECOLOGICAL STATE OF SEVASTOPOL COASTAL WATERS

Skuratovskaya E.N.¹, Doroshenko Yu.V.¹, Alyomova A.S.², Kovaleva M.A.¹¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: skuratovskaya2007@rambler.ru

² Voronezh State University

University Square, 1, Voronezh, 394018, Russia

Abstract. Active exploitation of coastal areas in combination with technogenic pollution inevitably leads to the depletion of biological resources and the deterioration of their condition. Sevastopol aquatic area is one of these areas, used as a collector of various pollutants. In this regard control of water pollution and the state of biota in Sevastopol bays are the main tasks of regional environmental monitoring using bioindication methods. Microbial indication methods make it possible to detect and control the appearance of pollutants in water much earlier than the irreversible toxic effects of aquatic organisms occur. Mussels are often used as bioindicators of seawater pollution, due to the significant accumulation of pollutants in their body at a relatively low concentration of pollutants in the environment. Ecological state of Sevastopol coastal waters was assessed. The studies were carried out in three Sevastopol bays with different levels of pollution in the summer 2019 - Laspi, Kazachya, Streletskaya. The estimation was based on the results of microbiological monitoring of bottom sediments (total number of heterotrophic bacteria and the number of hydrocarbon-oxidizing bacteria) and parameters of the prooxidant-antioxidant system (level of oxidized proteins and lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities) in hepatopancreas of mussel *Mytilus galloprovincialis*. Maximum abundance of heterotrophic and hydrocarbon-oxidizing microorganisms was found in soils of Streletskaya Bay, minimal abundance - in bottom sediments of Laspi. A significant increase of the prooxidant-antioxidant system parameters in hepatopancreas of mussels from Streletskaya Bay compared with Kazachya Bay and Laspi Bay was noted. The results obtained indicate a high level of pollution and less favorable living conditions for aquatic organisms in Streletskaya Bay. The studied indicators can be used in ecological monitoring of Sevastopol coastal waters for estimation the state of hydrobionts and their environment.

Key words: bioindicators, biomarkers, prooxidant-antioxidant system, mussels, heterotrophic bacteria, hydrocarbon-oxidizing bacteria, Black sea.

СКЕЛЕТНЫЕ МЫШЦЫ МОРСКИХ РЫБ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ УТИЛИЗАЦИИ КИСЛОРОДА (КРАТКИЙ ОБЗОР)

Солдатов А.А.^{1,2}, Парфенова И.А.³

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

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

³ ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»
просп. Академика Вернадского, г. Симферополь, 4295007, РФ

Поступила в редакцию: 18.07.2020

Аннотация. Обобщена информация об особенностях клеточного состава и молекулярных системах утилизации кислорода в скелетных мышцах костистых рыб. Рассмотрено их состояние в условиях нормоксии и гипоксии. Отмечено, что белые мышечные волокна имеют некомпенсированный тип организации дыхательной цепи митохондрий с явным преобладанием содержания цитохромов группы *aa*₃. При этом мышечная ткань имеет эффективные ферментативные системы, способные нейтрализовать образующийся при острой гипоксии и аноксии токсический лактат, переводя его в этанол, аланин, CO_2 , глюкозу, жиры. Показано, что функционирование цикла Кребса в условиях анаэробноза, обеспечивает дополнительный ресинтез АТФ на основе углеводных и белковых субстратов, ключевым элементом которого является высоко активный малик-фермент. Делается вывод о том, что скелетные мышцы и ряд других тканей у рыб изначально ориентированы на функционирование в условиях острого дефицита кислорода, а гипоксические состояния для них скорее являются нормой, чем исключением.

Ключевые слова: скелетные мышцы, костистые рыбы, метаболизм, дыхательная цепь митохондрий, гипоксия.

Введение.

Диффузия кислорода в водной среде протекает в среднем в 10000 раз менее эффективно, чем на воздухе [1]. Поэтому любое ограничение водообмена обычно сопровождается формированием устойчивых во времени гипоксических зон [2]. Принято считать, что водные организмы и, прежде всего, бентосные формы, обладают рядом уникальных механизмов, позволяющих поддерживать жизненные функции клеточных систем в условиях острого дефицита кислорода [3-5]. К ним можно отнести процессы сбалансированного угнетения мембранных и метаболических функций [6], некомпенсированный тип организации дыхательной цепи митохондрий [7-9], адаптивную перестройку метаболизма в направлении высокоэффективных анаэробных путей метаболизма [10-12].

Известно, что клетки тканей, в зависимости от направленности реакций энергетического обмена, принято делить на три основных типа [13].

- **Пентозный тип.** К нему относятся клеточные системы, в которых преобладает путь прямого окисления глюкозы (гексомонофосфатный путь). Фермент-субстратный комплекс цикла Кребса в них неактивен, а ресинтез АТФ обеспечивается за счет реакций гликолиза. Клетки данного типа малочувствительны к дефициту кислорода, а скорость потребления его в них низкая.
- **Тип Эмбдена-Мейергофа-Кребса.** В клетках данного типа доминируют гликолитические реакции и реакции цикла Кребса, которые обеспечивают совместно с дыхательной цепью митохондрий ресинтез значительных количеств АТФ. Путь прямого окисления глюкозы фактически не выражен.
- **Комбинированный тип.** К данному типу относятся клеточные системы, в которых сбалансировано функционируют все три метаболических пути.

Клетки, относящиеся к двум последним группам, обладают исключительно аэробным метаболизмом и крайне чувствительны к содержанию кислорода. Отсюда следует, что чувствительность тканей к PO_2 может определяться типом клеточных систем, которые ее составляют (клеточная композиция).

Скелетные мышцы костистых рыб являются удобным объектом для изучения этих аспектов проблемы, так располагают несколькими типами пространственно разобщенных клеточных систем (красные и белые мышечные волокна) с различной ориентацией тканевого метаболизма [14, 15]. В настоящем обзоре анализируется информация об особенностях их гистоструктуры, течения метаболических процессов, организации дыхательной цепи, а также чувствительности к дефициту кислорода.

Скелетные мышцы костистых рыб: основные типы клеточных систем.

Скелетные мышцы рыб, которые являются основным объектом рассмотрения в настоящей работе, содержат несколько типов мышечных волокон: красные, розовые и белые. Сравнительная оценка химического состава и особенностей их гистоструктуры впервые была проведена в ряде обзоров и монографий [15-17]. Позже этот вопрос неоднократно затрагивался в работах других авторов, в частности в обзоре I. A. Johnston [14]. Имеющаяся на сегодняшний день информация позволяет сделать однозначное заключение относительно функциональной специализации и чувствительности к содержанию кислорода данных клеточных систем.

Красные мышечные волокна. Относятся к типично аэробным клеточным системам. Крайне требовательны к содержанию кислорода. В сравнении с белыми мышцами они имеют высокий тканевой уровень PO_2 [8, 9, 18, 19]. Об этом свидетельствует самая высокая плотность митохондрий [14, 20, 21] и повышенная активность цитратсинтетазы [22-25]. Клетки активно расходуют АТФ. При высокой скорости утилизации глюкозы (по ^{14}C -глюкозе) [26], гликогена [27, 28], повышенной активности сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-редуктазы [20, 29] содержание АТФ в красном мышечном волокне было минимально [30, 31].

Характерной чертой данного типа мышечных клеток является высокая скорость β -окисления жирных кислот [28, 32]. Активность β -гидроксиацил-СоА-дегидрогеназы у них была максимальна [23-25]. В красных мышцах отмечали самый высокий уровень липидов и свободных жирных кислот [33-35, 36]. Их сухая масса тесно коррелировала с тканевым уровнем данных соединений [37]. В отношении ресурсов тканевого гликогена этого сказать нельзя. Полученные результаты оказались не однозначны. Имеется информация как о высоком [30], так и о низком содержании данного соединения [38, 39] в сравнении с белыми мышцами.

Белые мышечные волокна. Аэробные процессы в данной клеточной системе протекают менее эффективно [40]. Напряжение кислорода снижено [8, 9, 18, 19]. Плотность митохондрий, активность цитратсинтетазы значительно уступает таковой в красных мышцах [14, 21-25]. Свидетельством анаэробной направленности метаболизма в белых мышечных волокнах является высокая активность пируваткиназы и лактатдегидрогеназы [23-25, 30, 41, 42]. При этом утилизация углеводов (глюкозы, гликогена) клеткой протекает менее эффективно, чем в красных волокнах [26, 28]. Например, активность гликогенфосфоорилазы снижена в 2-3 раза [27]. Менее эффективна и фосфофруктокиназа. Уровень АТФ в белой мышечной ткани, напротив, достигает максимальных значений [30, 31]. Такое соотношение процессов указывает на низкую скорость энергетического обмена в данном типе клеток. Это косвенно отражает величина теплопродукции. В белых мышцах она существенно ниже, чем в красных и мало изменяется даже в состоянии мышечной активности [22, 43].

Белые мышцы рыб могут содержать значительный уровень каротиноидов, которые придают им соответствующую пигментацию [14]. При этом уровень жиров в них снижен [39]. Основным резервным энергетическим соединением является гликоген [38, 39].

Отличительной чертой белых мышечных волокон является высокий уровень клеточного белка – основная составляющая их сухого остатка [37] и хорошо развитая система каналов ретикулума [30]. Белые мышцы обладают наиболее выраженной миофибриллярной АТФ-азной активностью [33, 41]. Их клетки также содержат наиболее эффективные Mg^{2+} - и Ca^{2+} -АТФазы [30].

Розовые мышечные волокна. Количество публикаций, посвященных данному типу мышечных волокон, ограничено. Авторы расходятся во мнении относительно характера организации их клеточного метаболизма. Некоторые относят их к типично аэробным структурам [44], другие к анаэробным [41]. Учитывая пограничное расположение розовых мышц – между красными и белыми, очевидно, что они должны сочетать свойства и тех и других. Это доказывают сравнительные исследования, выполненные на карпе [30, 31]. Так, по содержанию гликогена они были близки к красным мышцам, тогда как по активности ферментов гликолиза: лактатдегидрогеназы и пируваткиназы, приближались к белым мышцам и даже превосходили их [30, 41]. Розовые волокна также, как и белые имели хорошо развитый ретикулум, высокую миофибриллярную Mg^{2+} - и Ca^{2+} -зависимую АТФазную активность. По уровню АТФ в клетке они занимали промежуточное положение [30, 31, 41]. Такой тип организации клеточного метаболизма скорее приближает их к анаэробным клеточным структурам с несколько усиленной аэробной активностью. Это доказывают эксперименты, выполненные на *Stenotomus chrysops* [44]. Запись миограммы при плавании *S. chrysops* в крейсерском режиме позволила выявить циклическую активность розовых мышц, что не свойственно белым. При этом в отличие от красных мышц розовые развивали большую силу при более коротком периоде сокращения, что приближало их к белым. Они дополняли работу красных мышц в момент, когда их аэробные возможности были исчерпаны.

Таким образом, в скелетных мышцах рыб присутствует 3 типа мышечных волокон с различной ориентацией метаболических процессов: анаэробной (белые волокна), аэробной (красные волокна) и смешанной (розовые волокна). Их соотношение (композиция) должно определять чувствительность ткани и организма к PO_2 . Виды с высокой долей красных мышц (пелагическая ихтиофауна) должны быть наиболее требовательны к содержанию кислорода в среде. Красная мышечная ткань у них может составлять до 48 % скелетной мускулатуры (сардина) [15]. Донные же малоподвижные виды, напротив, могут вообще не содержать типичных красных мышц [15, 45] и чувствительность к кислороду должна быть низкой.

Молекулярные системы утилизации кислорода.

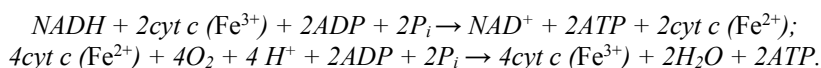
Основными потребителями кислорода в клетке являются митохондрии. Дыхательная цепь данного органоида использует его в качестве акцептора электронов при ресинтезе АТФ. Интенсивность тканевого дыхания зависит от ряда переменных:

- фосфатного потенциала [46]:

$$E = \frac{[ATP]}{[ADP] \cdot [P_i]};$$

- степени редукции цитохрома c (Fe^{2+}/Fe^{3+});
- отношения $NAD^+/NADH$.

Степень редукции цитохрома c ($cyt\ c$) напрямую связана с величиной тканевого PO_2 [47]. Эта зависимость вытекает из следующих уравнений:



В соответствии с уровнем тканевого PO_2 корректируется и величина сродства цитохромоксидазы к кислороду (K_M). Сведения по этому вопросу неоднозначны. Согласно одним данным система цитохромоксидаз может функционировать при достаточно низком PO_2 , близком к 1 мм рт. ст. С другой стороны, в ряде работ констатируются более высокие значения критического уровня PO_2 – 5 мм рт. ст. При этом указывается на то, что полное окисление субстрата происходит при 38 мм рт. ст. [47, 48]. Это означает, что величина K_M цитохромоксидазы может корректироваться, что отражает процесс адаптации дыхательной цепи митохондрий к функционированию в среде с различными величинами PO_2 .

Сведения о дыхательной цепи митохондрий рыб и круглоротых ограничены [49–51]. Сравнительная оценка показала, что для данной систематической группы организмов характерно более высокое содержание цитохрома a (aa_3), близкие концентрации цитохрома c ($c_1 + c$) и крайне низкий уровень цитохрома b в сравнении с наземными позвоночными [7–9, 52]. Эти отличия прослеживаются на уровне различных тканевых структур (сердца, скелетных мышц, печени). Особенно хорошо эта закономерность выражена в белых скелетных мышцах у донных рыб [9]. М.В. Савина [7] связывает это с более низкими значениями PO_2 в водной среде в сравнении с наземными условиями, а также с несовершенством систем кислородного обеспечения тканей рыб и круглоротых. Подобный некомпенсированный тип организации дыхательных цепей получил название «гипоксические цепи». Он часто встречается у организмов, сталкивающихся с дефицитом кислорода – ныряющие млекопитающие, птицы [50]. Рыбы реки Амазонки, использующие бимодальный тип дыхания, напротив, имеют дыхательные цепи, по стехиометрии, приближающиеся к дыхательным цепям наземных позвоночных [53]. В целом содержание цитохромов в тканях и активность электротранспортной цепи митохондрий рыб коррелировала с размерами их тела [54, 55] и уровнем естественной подвижности вида [9, 56]. Отмечено, что с возрастом активность цитохром- c -оксидазы подавлялась [57]. Направленные перестройки дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц отмечены у рыб при адаптации их к гипоксии и гипотермии [18, 19, 52, 58].

Дыхательная цепь митохондрий рыб активно реагировала на изменение состояния водной среды. В условиях низких температур был отмечен рост содержания цитохрома c в скелетных мышцах [59], повышение активности цитохром- c -оксидазы [60, 61]. Гипербария оказывала противоположный эффект на активность данного фермента, подавляя тканевое дыхание [62]. Негативное действие на цитохром- c -оксидазу выявлено со стороны ряда токсических соединений (фракций нефти, свинца) [63, 64]. Столь выраженная чувствительность терминального фермента дыхательной цепи к среде повышает вероятность возникновения гистотоксических вариантов гипоксии у данной систематической группы организмов.

О чувствительности тканей рыб к дефициту кислорода можно судить по величинам критических значений PO_2 для митохондрий. Однако такая информация для класса рыб крайне ограничена. Считается, что максимальная активность цитохромной системы у рыб и амфибий наблюдается при 10–15 мм рт. ст. (мозг) [65]. Это ниже значений, полученных для наземных позвоночных, и позволяет говорить о сравнительно низкой чувствительности рыб к дефициту кислорода. У других же гидробионтов (черви, моллюски) исследователи часто отмечали случаи оксиконформизма на субклеточном уровне в достаточно широком диапазоне PO_2 (21–360 мм рт. ст.) [66, 67]. Кислородная зависимость активности цитохром- c -оксидазы показана и для эмбрионов лосося (*Salmo trutta*) [68]. Это означает, что энергетический статус клетки напрямую связан с содержанием кислорода в среде и исключает какую-либо направленную коррекцию этой зависимости (оксирегуляция). Насколько эта ситуация свойственна классу рыб в целом не ясно.

Реакция клеточных систем на гипоксию.

Общая стратегия адаптации клеточных систем к дефициту кислорода выражается в сбалансированном угнетении энергетического обмена и переходе к суббазальным скоростям метаболизма [69, 70]. При этом сохраняются основные показатели жизнедеятельности клетки: концентрация АТФ и трансмембранные градиенты по Na^+ и K^+ . Данное явление было названо «метаболическим арестом» [70, 71].

Как уже отмечалось, стехиометрия цитохромов митохондрий рыб носит некомпенсированный характер с явным преобладанием содержания цитохрома aa_3 [7–9]. Это отражает способность данного органоида функционировать в условиях дефицита кислорода. Экспериментальная гипоксия еще более усиливает асимметрию дыхательной цепи [19, 58]. Активность цитохром- c -оксидазы существенно возрастает на фоне снижения потребления кислорода тканью [72].

В условиях острой гипоксии и аноксии, когда функционирование электрон-транспортной цепи полностью прекращается, в тканях активизируются анаэробные процессы, которые у рыб имеют ряд особенностей. Содержание гликогена, креатинфосфата в мышцах и печени снижается более чем на 90 %. Одновременно происходит падение фосфатного потенциала клеток и рост содержания лактата и пирувата [73–81]. Эти изменения наблюдаются на фоне увеличения активности LDG [82]. Считается, что продукция данного фермента находится под контролем *HIF-1* [82], который наряду с другими локусами экспрессируется гипоксией [83–85]. Уровень гликогена в миокарде при этом остается сравнительно высоким [79], скорость потребления глюкозы не изменяется [603], но содержание АТФ и креатинфосфата падает [86, 87]. Гипоксия способна индуцировать биосинтез белка в клетках миокарда и печени. О чем свидетельствует рост содержания РНК в этих тканях. При этом в клетках мозга она оказывает противоположное действие [88].

В плазме крови на фоне увеличения концентрации катехоламинов отмечается одновременный рост содержания глюкозы, лактата и K^+ [77, 89-93], а также развитие плазменного ацидоза [80, 94]. Отмечено, что гипоксия экспрессирует глюкозный мембранный протеин, облегчающий поступление глюкозы в клетку [95]. Авторы обсуждают роль ферментов цикла Кори печени в нейтрализации образующегося лактата [78, 79]. Рассмотренные выше метаболические эффекты гипоксии требуют от видов устойчивых к дефициту кислорода повышенных ресурсов гликогена в печени и мышцах и высокой буферной емкости крови [69]. Это отмечено для многих видов амазонских цихлид [96] и ряда морских рыб [94].

Анаэробноз у некоторых рыб (серебряный и золотой караси) сопровождается также ростом содержания этанола в белых и особенно красных мышцах [97-101]. Образование данного соединения связывают с декарбоксилированием пирувата до ацетальдегида с последующим восстановлением его до этанола при участии алкогольдегидрогеназы [98, 99]. Это исключает чрезмерное накопление токсичного лактата и повышает устойчивость организма к крайним вариантам гипоксии [74, 102]. Избыток этанола экскретируется в воду на уровне жабр. А. Waarde [103] связывает также образование этанола с распадом аланина.

Одним из необычных следствий аноксии является индукция синтеза жиров в тканевых структурах рыб. Подобное явление было отмечено для скелетных мышц серебряного и золотого карасей (*Carassius auratus gibelio*, *Carassius carassius*) [101]. Синтез данных соединений рассматривается как продолжение реакций анаэробного гликолиза. В плазме при этом отмечается снижение уровня свободных жирных кислот [92].

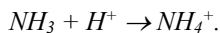
При дефиците *ATP* в условиях анаэробноза в клетках рыб активизируется аденилаткиназная реакция, приводящая к повышению концентрации *AMP*:



AMP не может быть акцептором P_i и подвергается дезаминированию с образованием инозинмонофосфата (*IMP*) при участии аденилатдеаминазы, которая в клетках рыб обладает повышенной активностью [104, 105]:



В условиях гипоксии активность данного фермента еще более возрастает [106]. Считается, что около 50 % NH_3 при аноксии образуется в мышцах рыб в реакциях пурин-нуклеотидного цикла (цикл Ловенштейна) [105]. Остальная часть связана с распадом аланина и окислением глутамата [103]. NH_3 в свою очередь задействуется при нейтрализации лактата:



Ферментативные системы митохондрий рыб также могут быть задействованы в анаэробных процессах генерации энергии. Посредством данного органоида сопрягаются гликолитические реакции с реакциями белкового катаболизма. Усиление продукции NH_4^+ в условиях внешнего дефицита кислорода отмечено для многих гидробионтов [73, 102, 107-109]. Показано, что гипоксия наряду с усилением анаэробного гликолиза приводит к снижению пула свободных аминокислот (особенно аспартата и аминокислот с разветвленной структурой радикала) и накоплению аланина и сукцината в тканях, в частности красных мышцах [10-12]. Содержание малата, оксалоацетата при этом снижается, а уровень α -кетоглутарата растет, что свидетельствует об усилении распада белков и процессов переаминирования отдельных аминокислот (глутамата и аланина) [110]. Метаболическая схема, предложенная T.G. Owen и P.W. Hochachka [111], хорошо объясняет наблюдаемые изменения (рис. 1). Она основана на сочетании двух процессов.

- Сукцинаттиокиназная реакция. Начинается с превращения гликолитического пирувата в аланин с образованием α -кетоглутарата, который в митохондриях окисляется до сукцината с восстановлением *GTP*. Процесс контролируется аланинаминотрансферазой, активность которой у рыб многократно превосходит таковую у наземных позвоночных [112]. Эта реакция также исключает образование токсичного лактата в тканях, что имеет решающее значение в перенесении гипоксических условий среды.
- Фумаратредуктазная реакция. Начинается с трансформации аспартата в оксалоацетат под контролем аспартатаминотрансферазы с последующим восстановлением до малата. При этом высвобождается глутамат, который может быть использован в предыдущей реакции. Малат, поступая в митохондрии, затем превращается в фумарат и восстанавливается до сукцината. Клетка получает при этом одну молекулу *ATP*. Эта реакция катализируется малатдегидрогеназой (*MDG*), активность которой в условиях гипоксии существенно повышается на фоне угнетения *LDG* [42, 113, 114].

Малат может образовываться и из фосфоенолпирувата (*ФЕП*) через щавелевоуксусную кислоту при участии фосфоенолпируваткарбоксикиназы (*ФЕПКК*) (рис. 2) [115]. Активность *ФЕПКК* повышается в аноксичных условиях в сравнении с пируваткиназой, что ограничивает трансформацию *ФЕП* в пируват. В митохондриях малат может метаболизироваться в двух направлениях:

- в фумарат, а затем в сукцинат с восстановлением *ATP*;
- в пируват при участии малик-фермента, а затем ацетил-*CoA*; последнее соединение метаболизируется фрагментом цикла Кребса до сукцината; ресурс *NADH*, образующийся на данном этапе может быть использован в предыдущей реакции на этапе восстановления фумарата в сукцинат.

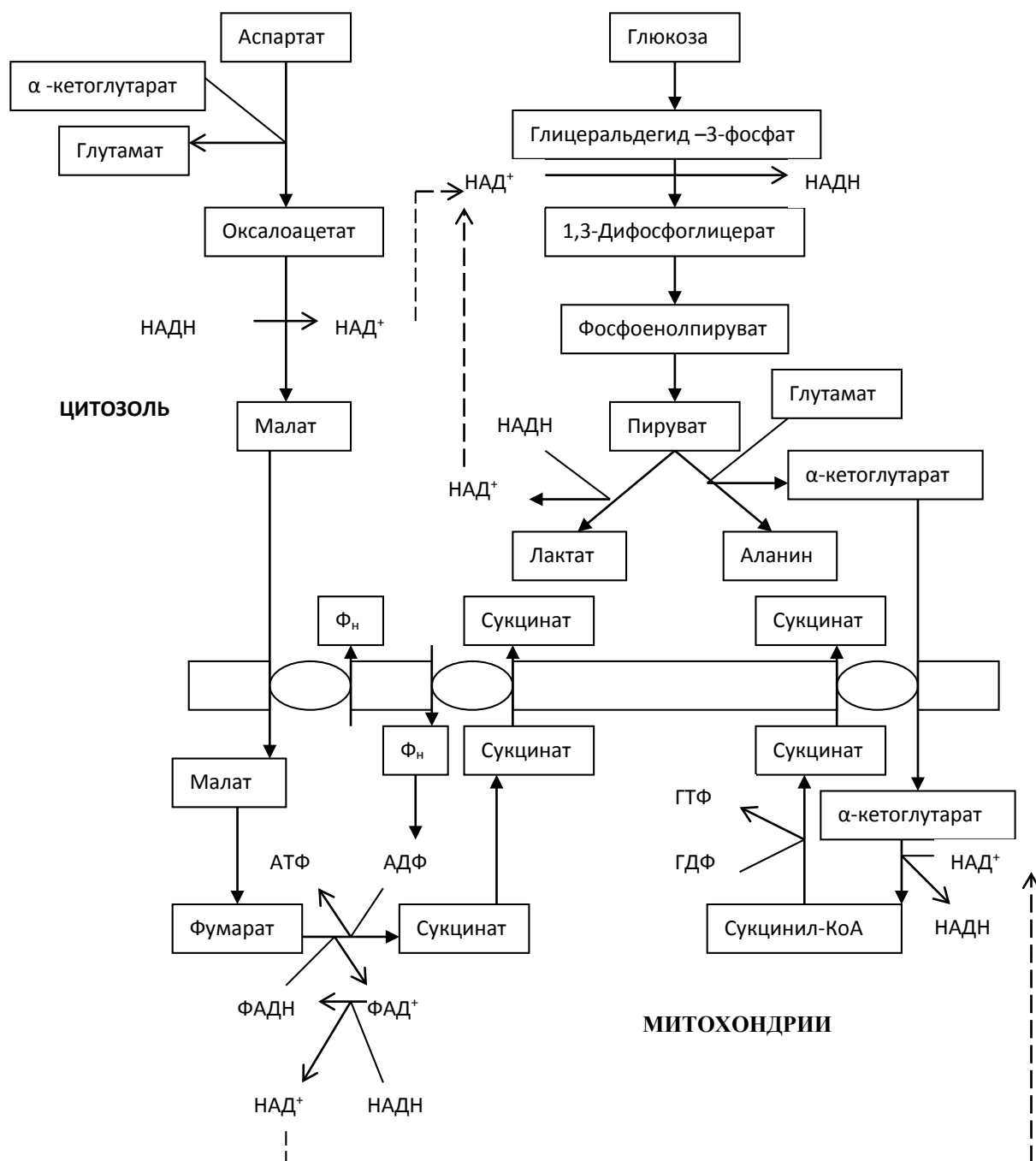


Рисунок 1. Метаболическая схема использования белков и углеводов митохондриями мышц в условиях анаэробноза [по 111]

Рассмотренные выше процессы, позволяют клеткам рыб в условиях анаэробноза получать дополнительно к гликолитическому определенный ресурс энергии в виде молекул *ATP* и *GTP*. Однако это возможно только при условии функциональной полноценности митохондрий, которая напрямую зависит от характера катионного обмена на уровне цитоплазматической мембраны клетки. В условиях дефицита энергии (*ATP*) активности Ca^{2+} -*ATP*азы и Na^{+} , K^{+} -*ATP*азы падают [110, 116]. Это должно сопровождаться диссипацией ионных градиентов и в частности повышением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Подобная ситуация отмечена для печени карпа [110]. Ca^{2+} связывается с фосфолипазой A_2 внутренней мембраны митохондрий, которая в анаэробных условиях начинает расщеплять фосфолипиды, повреждая в конечном итоге органноид в целом [116]. Такая последовательность процессов характерна для клеток многих позвоночных. У рыб, устойчивых к гипоксии, подобное явление не наблюдается. Показано, что их клетки способны ограничивать число функционирующих Na^{+} , K^{+} и Ca^{2+} каналов на цитоплазматической мембране в условиях аноксии [70, 71]. Это снижает энерготраты клеток, сохраняет ионные градиенты и функциональную полноценность митохондрий.

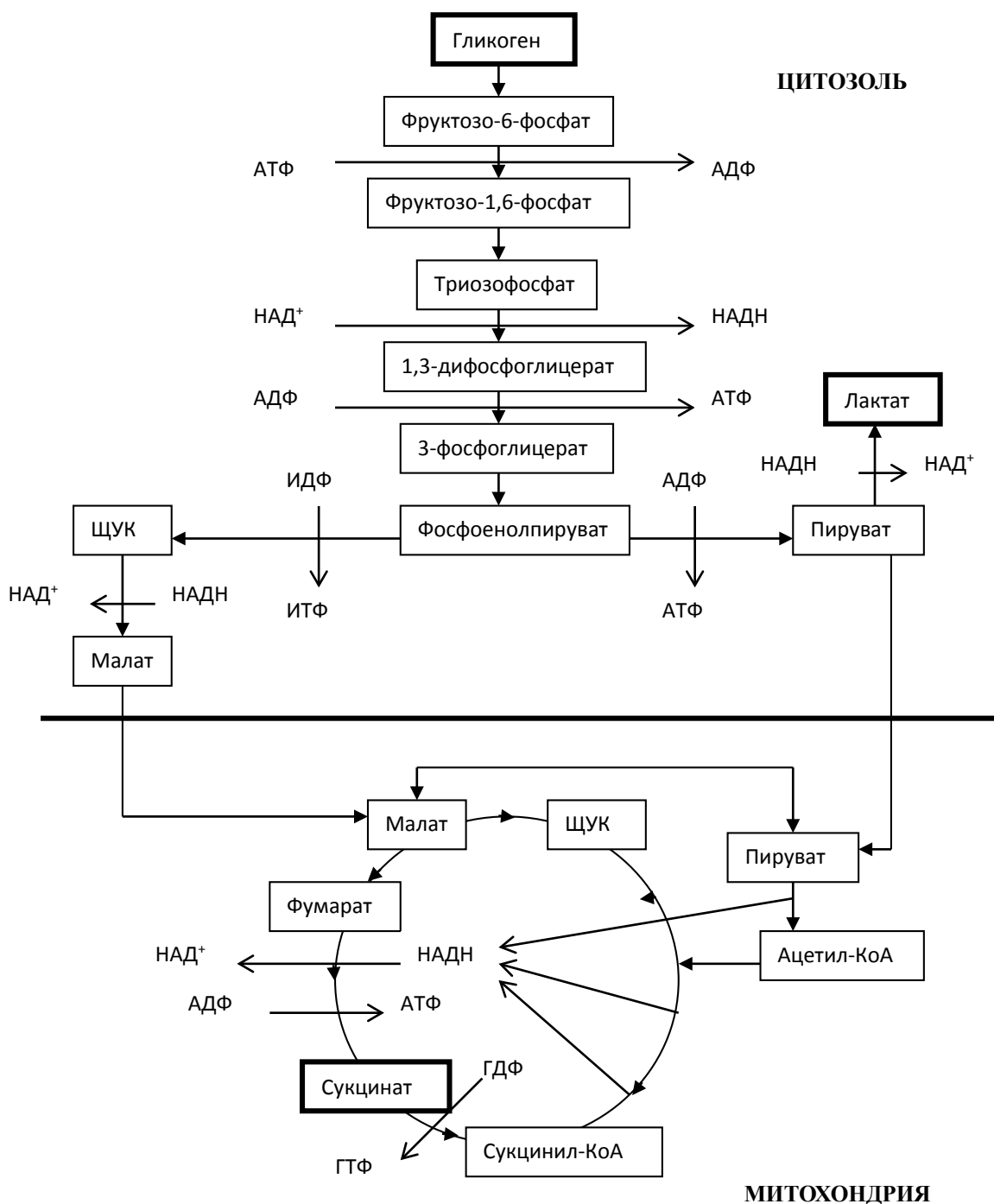


Рисунок 2. Функционирование цикла Кребса в условиях аноксии [по 115] (ЩУК – щавелево-уксусная кислота)

Наряду с реорганизацией метаболизма в условиях гипоксии отмечается также повышение антиоксидантного статуса клеточных систем. Многие исследователи связывают это с подготовкой клетки к процессу реоксигенации, так как окислительная нагрузка при низком PO_2 уменьшается [69, 117, 118]. Известно, что дефицит кислорода понижает устойчивость клеток к действию токсических соединений [119].

Подводя итог настоящему подразделу можно заключить, что клетки тканей рыб изначально ориентированы на функционирование в условиях острого дефицита кислорода. Об этом свидетельствует:

- некомпенсированный тип организации дыхательной цепи митохондрий с явным преобладанием содержания цитохромов группы aaz_3 ;
- наличие эффективных ферментативных систем способных нейтрализовать образующийся при острой гипоксии и аноксии токсический лактат, переводя его в этанол, аланин, CO_2 , глюкозу, жиры;
- функционирование цикла Кребса в условиях анаэробноза, обеспечивающего дополнительный ресинтез ATP на основе углеводных и белковых субстратов, ключевым элементом которого является высоко активный малик-фермент (сукцинаттиокиназная и фумаратредуктазная реакции).

Такая направленность метаболизма клеточных систем рыб свидетельствует о том, что для данной систематической группы организмов гипоксические состояния скорее являются нормой, чем исключением.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при частичной поддержке проекта РФФИ (№ 20-44-920001).

Список литературы / References:

1. Nilsson G.E., Renshaw G.M.C. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J. Exp. Biol.*, 2004, vol. 207, pp. 3131-3139. 04.
2. Joyce S. The dead zones: oxygen-starved coastal waters. *Environ. Health Persp.*, 2000, vol. 108, no. 3, pp. A120-A125.
3. El Albani A., Bengtson S., Canfield D.E., Bekker A., Macchiarelli R., Mazurier A., Meunier A. Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature*, 2010, vol. 466, no. 7302, pp. 100-104.
4. Danovaro R., Dell'Anno A., Pusceddu A., Gambi C., Heiner I., Kristensen R.M. The first metazoa living in permanently anoxic conditions. *BMC Biol.*, 2010, vol. 8, no. 1, p. 30.
5. Soldatov A.A., Andreenko T.I., Sysoeva I.V., Sysoev A.A. Tissue specificity of metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Br. under conditions of experimental anoxia. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2009, vol. 45, no. 3, pp. 349-355.
6. Soldatov A.A., Andreeva A.Yu., Novitskaya V.N., Parfenova I.A. Coupling of membrane and metabolic function in nucleated erythrocytes of *Scorpaena porcus* L. under hypoxia *in vivo* and *in vitro*. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2014, vol. 50, no. 5, pp. 409-415.
7. Савина М.В. Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных. С.-Петербург: Наука, 1992, 200 с. [Savina M. V. *Mechanisms of adaptation of tissue respiration in the evolution of vertebrates*. Saint-Petersburg: Nauka, 1992, 200 p. (In Russ.)]
8. Soldatov A.A. Cytochrome System and Oxygen Tension in Muscle Tissue of Salt-Water Fish with Different Natural Activity. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 1996, vol. 32, no. 2, pp. 112-115.
9. Солдатов А.А., Парфенова И.А. Стехиометрия цитохромов и напряжение кислорода в скелетных мышцах морских рыб. *Укр. биох. журн.*, 2014, т. 96, № 2, с. 60-67. [Soldatov A.A., Parfenova I.A. Stoichiometry of cytochromes and oxygen tension in skeletal muscles of marine fish. *Ukr. Biochem. J.*, 2014, vol. 96, no. 2, pp. 60-67. (In Russ.)]
10. Hughes G.M., Johnston I.A. Some responses of the electric ray (*Torpedo marmorata*) to low ambient oxygen tensions. *J. Exp. Biol.*, 1978, vol. 73, pp. 107-117.
11. Waarde A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, vol. 91 B, no. 2, pp. 207-228.
12. Waarde A., Thillart G., Kesbeke F. Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Comp. Physiol.*, 1983, vol. 149 B, no. 4, pp. 469-475.
13. Страйер Л. Биохимия. М.: Мир, 1984, т. 1, 232 с. [Strajer L. *Biohimiya*. М.: Mir, 1984, vol. 1, 232 p. (In Russ.)]
14. Johnston I.A. Implications of Muscle Growth Patterns for the Colour and Texture of Fish. *Farmed fish quality kestin*. Osney Mead Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001, pp. 13-30.
15. Love R.M. *The chemical biology of fish*. London: Academic Press, 1980, vol. 2, 943 p.
16. Drummond G. Muscle metabolism. *Fortschritte der Zoologie*, 1967, vol. 18, pp. 359-429.
17. Wittenberger C. Metabolic interaction between isolated white and red carp muscle. *Rev. Roum. Biol. Ser. Zool.*, 1973, vol. 18, pp. 71-76.
18. Солдатов А.А., Парфенова И.А. Напряжение кислорода в крови, скелетных мышцах и особенности тканевого метаболизма кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии. *Пробл. криобиологии*, 2009, т. 19, № 3, с. 290-300. [Soldatov A.A., Parfenova I.A. Oxygen tension in blood, skeletal muscles and features of tissue metabolism of golden mullet in experimental hypothermia. *Problems of Cryobiology*, 2009, vol. 19, no. 3, pp. 290-300. (In Russ.)]
19. Солдатов А.А. Напряжение кислорода в крови, скелетных мышцах и особенности тканевого метаболизма у кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso, 1810) в условиях острой экспериментальной гипоксии. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2018, т. 3, № 4, с. 724-729. [Soldatov A.A. Oxygen tension in the blood, skeletal muscles and features of tissue metabolism in the singil mullet (*Liza aurata* Risso, 1810) under conditions of acute experimental hypoxia. *Current Iss. Biol. Physics and Chemistry*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 724-729. (In Russ.)]
20. Knoerr S., Bohl M., Braunbeck T. Development of red and white muscle in juvenile Danube salmon (*Hucho hucho*) under the influence of different water currents – a contribution to optimized conditions for reintroduction into natural habitats. *Verh. Ges. Ichthyol.*, 1998, vol. 1, pp. 109-127.
21. Saenger A.M., Kim Z.S., Adam H. The fine structure of muscle fibres of roach, *Rutilus rutilus* (L.), and chub, *Leuciscus cephalus* (L.), *Cyprinidae*, *Teleostei*: Interspecific differences and effects of habitat and season. *J. Fish Biol.*, 1990, vol. 36, no. 2, pp. 205-213.
22. Dickson K.A., Johnson N.M., Donley J.M., Hoskinson J.A., Hansen M.W., Tessier J.D. Ontogenetic changes in characteristics required for endothermy in juvenile black skipjack tuna (*Euthynnus lineatus*). *J. Exp. Biol.*, 2000, vol. 203, no. 20, pp. 3077-3087.

23. Leonard J.B.K. Regional variation in muscle metabolic enzymes in individual American shad (*Alosa sapidissima*). *Can. J. Zool.*, 1999, vol. 77, no. 8, pp. 1322-1326.
24. Leonard J.B.K., McCormick S.D. Effects of migration distance on whole-body and tissue-specific energy use in American shad (*Alosa sapidissima*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1999, vol. 56, no. 7, pp. 1159-1171.
25. Leonard J.B.K., McCormick S.D. The effect of migration distance and timing on metabolic enzyme activity in an anadromous clupeid, the American shad (*Alosa sapidissima*). *Fish. Physiol. Biochem.*, 1999, vol. 20, no. 2, pp. 163-179.
26. Hemre G.I., Kahrs F. ^{14}C -glucose injection in Atlantic cod, *Gadus morhua*, metabolic responses and excretion via the gill membrane. *Aquacult. Nutr.*, 1997, vol. 3, no. 1, pp. 3-8.
27. Hyvaerinen H., Holopainen I.J., Piironen J. Anaerobic wintering of crucian carp (*Carassius carassius* L.). 1. Annual dynamics of glycogen reserves in nature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985, vol. 82 A, no. 4, pp. 797-803.
28. West T.G., Schulte P.M., Hochachka P.W. Implications of hyperglycemia for post-exercise resynthesis of glycogen in trout skeletal muscle. *J. Exp. Biol.*, 1994, vol. 189, pp. 69-84.
29. Modigh M., Tota B. Mitochondrial respiration in the ventricular myocardium and in the white and deep red myotomal muscles of juvenile tuna fish (*Thunnus thynnus* L.). *Acta Physiol. Scand.*, 1975, vol. 93, no. 3, pp. 289-294.
30. Jabarsyah A., Tsuchimoto M., Yada O., Kozuru Ya., Miyake T., Misima T., Wang Q., Tachibana K. Comparison of biochemical and physiological characteristics among white, pink, and red muscle fibers in carp (cultured). *Fish Sci.*, 2000, vol. 66, no. 3, pp. 586-593.
31. Yada O., Tsuchimoto M., Wang Q., Apablaza P.A.G., Jabarsyah A., Tachibana K. Differences of muscle fiber type and temporal change of K-value among parts toward depth of dorsal muscle in carp (cultured). *Fish Sci.*, 2000, vol. 66, no. 1, pp. 147-152.
32. Froyland L., Lie O., Berge R. Mitochondrial and peroxisomal β -oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquacult. Nutr.*, 2000, vol. 6, no. 2, pp. 85-89.
33. Carpena E., Martin B., Libera L.D. Biochemical differences in lateral muscle of wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish. Physiol. Biochem.*, 1998, vol. 19, no. 2, pp. 229-238.
34. De'Oliveira E.G., Urbinati E.C., Souza V.L., Roviero D.P. Glycogen levels in different tissues of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *Bol. Inst. Pesca-Sao-Paulo*, 1997, vol. 24, pp. 89-95.
35. El-Casfi M. Effects of water low salinity on tissular lipids in white and red muscle of *Liza aurata*. *Ichthyophysiol. Acta.*, 1998, no. 21, pp. 15-25.
36. El-Casfi M., Romdhane M.S., Chanussot F., Cherif A. Variation of the lipid composition of the muscle of mullet *Liza aurata* living in two sites of different salinity. *Proc. Symp. Brest.*, 19-20, November 1998. Plouzane France Ifremer, 2000, no. 27, pp. 130-139.
37. Kiessling A., Aasgaard T., Storebakken T., Johansson L., Kiessling K.H. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. 3. Chemical composition. *Aquaculture*, 1991, vol. 93, no. 4, pp. 373-387.
38. De'Oliveira E.G., Urbinati E.C., Souza V.L., Roviero D.P. Visceral liposomatic index (VLSI) and total lipid levels in different body tissues of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *Bol. Inst. Pesca-Sao-Paulo*, 1997, vol. 24, pp. 97-103.
39. George J.C., Stevens E.D. Fine structure and metabolic adaptation of red and white muscles in tuna. *Environ. Biol. Fish.*, 1978, vol. 3, no. 2, pp. 185-191.
40. Driedzic W.R., Hochachka P.W. The unanswered question of high anaerobic capabilities of carp white muscle. *Can. J. Zool.*, 1975, vol. 53, pp. 706-712.
41. Johnston I.A., Davison W., Goldspink G. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.*, 1977, vol. 114, no. 2, pp. 203-216.
42. Martinez M.L., Landry C., Boehm R., Manning S., Cheek A.O., Rees B.B. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *J. Exp. Biol.*, 2006, vol. 209, no. 19, pp. 3851-3861.
43. Матюхин В.А., Нешумова Т.В., Дементьев Я.В. Изменения температуры красных и белых мышц байкальского хариуса *Thymallus arcticus baicalensis* Dyb. при различных скоростях плавания. *Вопр. ихтиол.*, 1975, т. 15, № 5, с. 884-889. [Matyukhin V.A., Neshumova T.V., Dementiev Ya.V. Temperature changes of red and white muscles of the Baikal grayling *Thymallus arcticus baicalensis* Dyb. at different swimming speeds. *Ichthyol. J.*, 1975, vol. 15, no. 5, pp. 884-889. (In Russ.)]
44. Coughlin D.J., Rome L.C. Muscle activity in steady swimming scup, *Stenotomus chrysops*, varies with fiber type and body position. *Bull. Mar. Biol. (Lab. Woods Hole)*, 1999, vol. 196, no. 2, pp. 145-152.
45. Кондратьева Т.П., Астахова Л.П. Морфологические и биохимические особенности белых и красных мышц при различных физиологических состояниях. Тр. Карадагского филиала ИнБЮМ НАН Украины, Севастополь, 1997, с. 111-120. [Kondratieva T.P., Astakhova L.P. Morphological and biochemical features of white and red muscles in various physiological states. Proc. Karadag Branch IBSS NAS Ukr., Sevastopol, 1997, pp. 111-120. (In Russ.)]
46. Chance B., Oshino N., Sugano T., Mayevsky A. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1973, vol. 37, pp. 277-292.
47. Wilson A., Owen Cn., Erecinska M. Quantitative dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation on oxygen concentration: A mathematical model. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, vol. 195, no. 2, pp. 494-504.

48. Lubbers D., Kessler M. Oxygen supply and the rate of tissue respiration. *Oxygen transport in blood and tissue*. Stuttgart: Tieme, 1968, pp. 90-99.
49. Савина М.В., Маслова Г.М., Демин В.И., Бакланова С.М. Исследование цитохромов в соматической и сердечной мышцах миноги *Lampetra fluviatilis* L. *Ж. эволюц. биох. физиол.*, 1981, т. 17, № 3, с. 246-253. [Savina M.V., Maslova G.M., Demin V.I., Baklanova S.M. Study of cytochromes in the somatic and cardiac muscles of lampreys *Lampetra fluviatilis* L. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.* 1981, vol. 17, no. 3, pp. 246-253. (In Russ.)]
50. Richardson T., Tappel A.L., Smith L.M., Houle C.R. Polyunsaturated fatty acids in mitochondria. *J. Lipid Res.*, 1962, vol. 3, pp. 344-350.
51. Wodtke E. Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome C oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Biochim. biophys. acta.*, 1981, vol. 640, no. 3, pp. 710-720.
52. Солдатов А.А., Парфенова И.А. Цитохромная система и уровень миоглобина в скелетных мышцах кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) в условиях экспериментальной гипотермии. *Труды ИБВВ РАН*, 2017, № 80 (83), с. 69-75. [Soldatov A.A., Parfenova I.A. Cytochrome system and myoglobin level in the skeletal muscles of the mullet-singil (*Liza aurata* Risso) under experimental hypothermia. *Proc. IBIW RAS*, 2017, no. 80 (83), pp. 69-75. (In Russ.)]
53. Wilson M.T., Bonaventura J., Brunory M. Mitochondrial cytochrome content and cytochrome oxidase activity of some amazonian fish. *Comp. Biochem Physiol.*, 1979, vol. 62 A, pp. 245-249.
54. Martinez M., Dutil J.D., Guderley H. Longitudinal and allometric variation in indicators of muscle metabolic capacities in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Exp. Zool.*, 2000, vol. 287, no. 1, pp. 38-45.
55. Rodnick K.J., Williams S.R. Effects of body size on biochemical characteristics of trabecular cardiac muscle and plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1999, vol. 122 A, no. 4, pp. 407-413.
56. Garenc C., Couture P., Laflamme M., Guderley H. Metabolic correlates of burst swimming capacity of juvenile and adult threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Comp. Physiol.*, 1999, vol. 169, no. 2, pp. 113-122.
57. Phillips M.C.L., Moyes C.D., Tufts B.L. The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J. Exp. Biol.*, 2000, vol. 203, no. 6, pp. 1039-1045.
58. Soldatov A.A., Savina M.V. Effect of hypoxia on the content and stoichiometry of cytochromes in muscle of the gray mullet *Liza aurata*. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2008, vol. 44, no. 5, pp. 599-604.
59. Sidell B.D. Turnover of cytochrome c in skeletal muscle of green sunfish (*Lepomis cyanellus* R.) during thermal acclimation. *J. Exp. Zool.*, 1977, vol. 199, no. 2, pp. 233-250.
60. Blier P.U., Lemieux H. The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *J. Comp. Physiol.*, 2001, vol. 171, no. 3, pp. 247-253.
61. Wilson F.R., Somero G., Prosser C.L. Temperature-metabolism relations of two species of *Sebastes* from different thermal environments. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1974, vol. 47, no. 2 B, pp. 485-491.
62. Sebert P., Simon B., Barthelemy L. Hydrostatic pressure induces a state resembling histotoxic hypoxia in *Anguilla Anguilla*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993, vol. 105 A, no. 2, pp. 255-258.
63. Cohen A., Nugegoda D., Gagnon M.M. Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2001, vol. 48, no. 3, pp. 306-310.
64. Reddy S.J., Kalarani V., Tharakanadha B., Reddy D.C., Ramamurthi R. Changes in energy metabolism of the fish, *Labeo rohita* in relation to prolonged lead exposure and recovery. *J. Ecotoxicol. Environ. Monitoring*, 1998, vol. 8, no. 1, pp. 43-53.
65. Вержбинская Н.А. Цитохромная система мозга в филогенезе позвоночных животных. *Физиол. ж. СССР*, 1953, т. 39, no. 1, с. 17-26. [Verzhbinskaya N.A. cytochrome system of the brain in the phylogeny of vertebrates. *Physiol. J. USSR*, 1953, vol. 39, no. 1, pp. 17-26. (In Russ.)]
66. Buchner T., Abele D., Poertner H.O. Oxyconformity in the intertidal worm *Sipunculus nudus*: the mitochondrial background and energetic consequences. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2001, vol. 129, no. 1, pp. 109-120.
67. Tschischka K., Abele D., Poertner H.O. Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the Baltic and White Seas. *J. Exp. Biol.*, 2000, vol. 203, no. 21, pp. 3355-3368.
68. Matschak T.W., Tyler D.D., Stickland N.C. Metabolic enzyme activities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) embryos respond more to chronic changes in oxygen availability than to environmental temperature. *Fish Physiol. Biochem.*, 1998, vol. 18, no. 2, pp. 115-123.
69. Bickler P.E., Buck L.T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.*, 2007, vol. 69, pp. 145-170.
70. Vornanen M., Paajanen V. Seasonality of dihydropyridine receptor binding in the heart of an anoxia-tolerant vertebrate, the crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004, vol. 287, no. 5, pp. R1263-R1269.
71. Hochachka P. Defence strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 1986, vol. 231, pp. 324-241.
72. Zhou B.S., Wu R.S., Randall D.J., Lam P.K., Ip Y.K., Chew S.F. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *J. Fish Biol.*, 2000, vol. 57, no. 5, pp. 1160-1171.
73. Chew S.F., Gan J., Ip Y.K. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of estivation in mud. *Physiol. Biochem. Zool.*, 2005, vol. 78, no. 4, pp. 620-629.

74. Dorigatti M., Krumschnabel G., Schwarzbaum P.J., Wieser W. Effects of hypoxia on energy metabolism in goldfish hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, vol. 117 B, no. 1, pp. 151-158.
75. Herbert N.A., Wells R.M. The aerobic physiology of the air-breathing blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, necessitates behavioural regulation of breath-hold limits during hypoxic stress and predatory challenge. *J. Comp. Physiol. B.*, 2001, vol. 171, no. 7, pp. 603-612.
76. Ip Y.K., Kuah S.S., Chew S.F. Strategies adopted by the mudskipper *Boleophthalmus boddarti* to survive sulfide exposure in normoxia or hypoxia. *Physiol. Biochem. Zool.*, 2004, vol. 77, no. 5, pp. 824-837.
77. MacCormack T.J., Lewis J.M., Almeida-Val V.M., Val A.L., Driedzic W.R. Carbohydrate management, anaerobic metabolism, and adenosine levels in the armoured catfish, *Liposarcus pardalis* (castelnau), during hypoxia. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.*, 2006, vol. 305, no. 4, pp. 363-375.
78. Moraes G., Chippari A.R., Guerra C.D.R., Gomes L.C., Souza R.H.S. Immediate changes on metabolic parameters of the freshwater teleost fish *Piaractus mesopotamicus* (PACU) under severe hypoxia. *Bol. Tec. Cepta.*, 1997, vol. 10, pp. 45-52.
79. Moraes G., Choudhuri J.V., Souza R.H.S. Metabolic strategies of *Hypostomus regani* (Cascudo), a freshwater teleost fish under extreme environmental hypoxia. *Bol. Tec. Cepta.*, 1997, vol. 10, pp. 35-44.
80. Pincetich C.A., Viant M.R., Hinton D.E., Tjeerdema R.S. Metabolic changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) during embryogenesis and hypoxia as determined by in vivo ³¹P NMR. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2005, vol. 140, no. 1, pp. 103-113.
81. Van Ginneken V.J.T., Van den Thillart G.E.E.J., Muller H.J., Van Deursen S., Onderwater M., Visee J., Hopmans V., Van Vliet G., Nicolay K. Phosphorylation state of red and white muscles in tilapia during graded hypoxia: an in vivo ³¹P-NMR study. *Am. J. Physiol. Regul. Integrat. Comp. Physiol.*, 1999, vol. 277, pp. 1501-1512.
82. Rees B.B., Bowman J.A.L., Schulte P.M. Structure and sequence conservation of a putative hypoxia response element in the lactate dehydrogenase-B gene of *Fundulus*. *Biol. Bull.*, 2001, vol. 200, pp. 247-251.
83. Bosworth C.A., Chou C.W., Cole R.B., Rees B.B. Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure. *Proteomics*, 2005, vol. 5, no. 5, pp. 1362-1371.
84. Ju Z., Wells M.C., Heater S.J., Walter R.B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 2007, vol. 145, no. 1, pp. 134-144.
85. Vleugel M.M., Bos R., Buerger H., van der Groep P., Saramaki O.R., Visakorpi T., van der Wall E., van Diest P.J. No amplifications of hypoxia-inducible factor-1 α gene in invasive breast cancer: a tissue microarray study. *Cell. Oncol.*, 2004, vol. 26, no. 5-6, pp. 347-351.
86. Jensen M.A., Gesser H. Influence of inorganic phosphate and energy state on force in skinned cardiac muscle from freshwater turtle and rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.*, 1999, vol. 169, no. 6, pp. 439-444.
87. Overgaard J., Gessre H. Force development, energy state and ATP production of cardiac muscle from turtles and trout during normoxia and severe hypoxia. *J. Exp. Biol.*, 2004, vol. 207, pp. 1915-1924.
88. Smith R.W., Houlihan D.F., Nilsson H.E., Alexandre J. Tissue-specific changes in RNA synthesis in vivo during anoxia in crucian carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integrat. Comp. Physiol.*, 1999, vol. 277, pp. 690-697.
89. MacCormack T.J., Driedzic W.R. The impact of hypoxia on in vivo glucose uptake in a hypoglycemic fish, *Myoxocephalus scorpius*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2007, vol. 292, no. 2, pp. R1033-R1042.
90. Plante S., Chabot D., Dutil J. Hypoxia tolerance in Atlantic cod. *J. Fish Biol.*, 1998, vol. 53, no. 6, pp. 1342-1356.
91. Raaij M.T.M., Pit D.S.S., Balm P.H.M., Steffens A.B., Thillart G.E.E.J.M. Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Horm. Behav.*, 1996, vol. 30, no. 1, pp. 85-92.
92. Raaij M.T.M., Thillart G.E.E.J.M., Vianen G.J., Pit D.S.S., Balm P.H.M., Steffens A.B. Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) during deep hypoxia and subsequent recovery. *J. Comp. Physiol.*, 1996, vol. 166, no. 7, pp. 443-452.
93. Wells R.M., Baldwin J. Plasma lactate and glucose flushes following burst swimming in silver trevally (*Pseudocaranx dentex*: *Carangidae*) support the "releaser" hypothesis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 2006, vol. 143, no. 3, pp. 347-352.
94. Jackson D.C. Acid-base balance during hypoxic hypometabolism: selected vertebrate strategies (review). *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2004, vol. 141, no. 3, pp. 273-283.
95. Zhang Z., Wu R.S.S., Mok H.O.L., Wang Y., Poon W.W.L., Cheng S.H., Kong R.Y.C. Isolation, characterization and expression analysis a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Eur. J. Biochem.*, 2003, vol. 270, pp. 3010-3017.
96. Chippari-Gomes A.R., Gomes L.C., Lopes N.P., Val A.L., Almeida-Val V.M. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2005, vol. 141, no. 3, pp. 347-355.
97. Bidinotto P.M., Moraes G., Souza R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Tec. Cepta.*, 1997, vol. 10, pp. 53-60.
98. Johnston I.A., Bernard L.M. Utilization of the ethanol pathway in carp following exposure to anoxia. *J. Exp. Biol.*, 1983, vol. 104, pp. 73-78.
99. Jurss K. Athanol – ein Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels von Fischen. *Biol. Rdsch.*, 1982, vol. 20, no. 3, pp. 178.

100. Lutz P.L., Nilsson G.E. Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up or down. *J. Exp. Biol.*, 1997, vol. 200, pp. 411-419.
101. Waverveld J., Addink A.D.F., Thillart G. The anaerobic energy metabolism of goldfish determined by simultaneous direct and indirect calorimetry during anoxia and hypoxia. *J. Comp. Physiol.*, 1989, vol. 159 B, no. 3, pp. 263-268.
102. Thillart G., Waarde A. Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.* 1985, vol. 8, no. 3, pp. 393-409.
103. Waarde A. Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1983, vol. 74, no. 4, pp. 675-684.
104. Jorgensen J.B., Mustafa T. The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in flounder (*Platichthys flesus* L.) II. High energy phosphate compounds and the role of glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1980, vol. 67 B, pp. 249-256.
105. Waarde A., De Wilde H.M. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.) pathway of aerobic and muscle mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 72 B, no. 1, pp. 133-136.
106. Lushchak V.I., Smirnova Y.D., Storey K.B. AMP-deaminase from sea scorpion white muscle: properties and redistribution under hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1998, vol. 119 B, no. 3, pp. 611-618.
107. Светличный Л.С., Юнева Т.В., Шульман Г.Е., Хаусман Дж. А. Использование белка в энергетическом обмене ветвистоусого рачка *Moina macrura* при различном содержании кислорода в воде. Докл. РАН, 1994, т. 337, № 3, с. 428-430. [Svetlichny L.S., Yuneva T.V., Shulman G.E., Hausman J.A. Use of protein in the energy exchange of the branchial crustacean *Moina micrura* at different oxygen content in water. Reports of Russian Academy of Sciences, 1994, vol. 337, no. 3, pp. 428-430. (In Russ.)]
108. Столбов А.Я., Ставицкая Е.Н., Шульман Г.Е. Потребление кислорода и экскреция азота у черноморских рыб различной экологической специализации при гипоксических режимах. *Гидробиол. ж.*, 1995, т. 31, № 1, с. 73-78. [Stolbov A.Ya., Stavitskaya E.N., Shulman G.E. Oxygen consumption and nitrogen excretion in black sea fish of various ecological specialization under hypoxic regimes. *Hydrobiol. J.*, 1995, vol. 31, no. 1, pp. 73-78. (In Russ.)]
109. Шульман Г.Е., Аболмасова Г.И., Столбов А.Я. Использование белка в энергетическом обмене гидробионтов. Усп. совр. биол., 1993, т. 113, № 5, с. 576-586. [Shulman G.E., Abolmasova G.I., Stolbov A.Y. Protein utilization in energy metabolism of hydrobionts. *Adv. Modern Biol.*, 1993, vol. 113, no. 5, pp. 576-586. (In Russ.)]
110. Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. Механизмы температурной акклимации рыб. К.: Наук. думка, 1991, 192 с. [Romanenko V.D., Arsan O.M., Solomatina V.D. Mechanisms of temperature acclimation of fish. Kiev: Naukova dumka, 1991, 192 p. (In Russ.)]
111. Owen T.G., Hochachka P.W. Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals. *Biochem. J.*, 1974, vol. 143, pp. 541-553.
112. Mommsen Th.P., French C.J., Hochachka P.W. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.*, 1980, vol. 58, pp. 1785-1799.
113. Almeida-Val V.M., Val A.L., Duncan W.P., Souza F.C., Paula-Silva M.N., Land S. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2000, vol. 125, no. 2, pp. 219-226.
114. Panepucci L., Fernandes M.N., Sanches J.R., Rantin F.T. Changes in lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, *Rhinelepis strigosa* (Siluriformes, Loricariidae). *Rev. Bras. Biol.*, 2000, vol. 60, no. 2, pp. 353-360.
115. Skorkowski E.F. Mitochondrial malic enzyme from crustacean and fish muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, vol. 90 B, pp. 19-24.
116. Брагин Е.О., Дергунов А.Д. и др. Роль фосфолипазы А2 в аноксическом повреждении энергозависимых функций митохондрий. Вопр. мед. химии, 1977, т. 23, № 5, с. 673-677. [Bragin E.O., Dergunov A.D. Role of phospholipase A2 in anoxic damage of energy-dependent mitochondrial functions. *Questions of medical chemistry*, 1977, vol. 23, no. 5, pp. 673-677. (In Russ.)]
117. Abele D., Puntarulo S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 2004, vol. 138, no. 4, pp. 405-415.
118. Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress (review). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2002, vol. 133, no. 4, pp. 537-556.
119. Hattink J., De Boeck G., Blust R. Toxicity, accumulation, and retention of zinc by carp under normoxic and hypoxic conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2006, vol. 25, no. 1, pp. 87-96.

SKELETAL MUSCLES OF MARINE FISH AND MOLECULAR OXYGEN UTILIZATION SYSTEMS (BRIEF OVERVIEW)

Soldatov A.A.^{1,2}, Parfenova I.A.³

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, Russian Academy of Sciences
Nakhimov Ave., 2, Sevastopol 299011, Russia; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

² Sevastopol State University
University St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

³ V.I. Vernadsky Crimean Federal University
Vernadsky Ave., 4, Simferopol, 295007, Russia

Abstract. The information on the characteristics of the cellular composition and molecular oxygen utilization systems in skeletal muscles of bony fish is summarized. Their state under conditions of normoxia and hypoxia is considered. It has been noted that white muscle fibers possess an uncompensated type of organization of the respiratory chain of mitochondria with a pronounced predominance in the content of cytochromes of the *aa₃* group. At the same time, muscle tissue has effective enzymatic systems that can neutralize toxic lactate formed during acute hypoxia and anoxia, converting it to ethanol, alanine, CO_2 , glucose and lipids. It has been shown that the functioning of the Krebs cycle under conditions of anaerobiosis provides additional *ATP* resynthesis based on carbohydrate and protein substrates, with a highly active malik-enzyme as the key element. It is concluded that the skeletal muscles and a number of other tissues in fish have been initially oriented towards functioning under conditions of acute oxygen deficiency, and for these organisms hypoxic conditions seem to be normal and not extraordinary ones.

Key words: *skeletal muscles, marine fish, metabolism, the respiratory chain of mitochondria, hypoxia.*

ВЫЯВЛЕНИЕ АДАПТОГЕННОГО И ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ НА ЭНЕРГЕТИКУ ЛЕЙКОЦИТОВ В НАТИВНОЙ КРОВИ ПО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОТЕНЦИАЛ - ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЗОНДА ДСМ

Акшинцев А.А.¹ Морозова Г.И.², Козлова М.А.¹ **Баренбойм Г.М.¹**

¹ Институт водных проблем РАН

ул. Губкина, 3, г. Москва, 119333, РФ; e-mail: mblshok@mail.ru mblshok@mail.ru

² Российский университет дружбы народов

ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: gimorozova@mail.ru

Поступила в редакцию: 18.07.2020

Аннотация. Актуален поиск природных адаптогенов, способных стабилизировать энергетический баланс клеток на фоне низких доз препаратов, загрязняющих воды. Целью работы является выявление адаптогенного и защитного действия экстрактов из термофильных сине-зеленых водорослей (ТВ1 и ТВ2), добытых из двух гидротерм Камчатки, на клетки в нативной крови. С помощью микроскопа- микрофлуориметра в нативных мазках донорской венозной крови распознавали лимфоциты (Л) и нейтрофилы (НФ) и оценивали суммарную трансмембранный потенциал на их внешней и митохондриальных мембранах (ТМП) по интенсивности и цвету флуоресценции полихроматического катионного зонда 4-(*n*-диметиламиностирила)-1-метилпиридиния (ДСМ) в клетках. Отношение между клеточными пулами с низкими и высокими ТМП-ми в популяциях Л или НФ использовали в качестве показателя энергетической активности клеточных популяций (ЭАП). В ходе испытаний ТВ *in vitro* на контрольных образцах крови обнаружен рост митохондриальной активности и ТМП в Л, но при этом снижение ТМП в НФ. Анализ опытных данных выявил достоверное снижение ЭАП после прединкубации крови с циклофосфамидом (Ц) (0,002 мг/л) при 37°C. Установлено, что ТВ1 (в отличие от ТВ2) частично восстанавливает ЭАП лимфоцитов и снижает токсичное действие Ц на митохондрии. Из сравнения полученных данных следует, что эти ТВ проявляют адаптогенную активность в крови, поскольку их эффекты зависят от разной исходной энергетической активности иммунных клеток в свежих и суточных образцах крови.

Ключевые слова: термофильные водоросли, адаптация, флуоресцентный зонд ДСМ, нативная кровь, лимфоциты, нейтрофилы, трансмембранные потенциалы, активность митохондрий, циклофосфамид.

Проблема адаптации и защиты клеток и организмов от низких доз лекарств, токсинов становится всё более актуальна в связи с резким ухудшением экологии водных ресурсов - загрязнением их биологически активными веществами [1]. В водах Канала им. Москвы и реки Истра нами был обнаружен противоопухолевый препарат циклофосфамид (Ц) в низких концентрациях 2-16 нг/л [1]. Как известно из клинической практики, иммунодепрессивное действие Ц проявляется в подавлении пролиферации лимфоцитарных клонов (преимущественно В-лимфоцитов), участвующих в иммунном ответе [13], что может быть опасным для нормальных иммунных клеток даже при малых дозах Ц. Сегодня популярны адаптогены, обладающие антиоксидантной активностью и тем самым позитивно влияющих на клеточные мембраны, на энергетический статус и ионный гомеостаз клеток [2]. В связи с этим в последние годы опять возрастает интерес к сине-зеленым термофильным водорослям (ТВ)- цианобактериям, которые живут в горячих источниках и поэтому генетически обладают необычными адаптогенными свойствами [2-4]. В ходе экспедиций 2012-2013 гг. на Камчатку нами были обследованы пробы из 16 видов гидротерм. Установлено, что наиболее распространенным и приспособленным является вид ТВ *Mastigocladus laminosus*, во втором месте находится вид *Phormidium tenue*. Биомасса ТВ разных видов характеризуется высоким содержанием белка, углеводов, невысоким - липидов, достаточно богатым комплексом витаминов, минеральных веществ (железо, магний, кальций, йод, бор, цинк, медь). Большинство ТВ способны синтезировать все органические вещества своей клетки за счет энергии света. Пигменты сине-зеленых ТВ представлены хлорофиллом *a*, *b*, также фикобилинами и каротиноидами и другими. Хлорофилл *a* составляет до 81% от количества спирторастворимых пигментов. Известно бактерицидное и антиоксидантное действие хлорофилла в отношении мембран клеток [2-4]. Клеточные тесты для испытания воздействий биологически активных веществ с помощью флуоресцентных зондов-ионов [2, 6-11] основаны на принципе эпиморфизма между аэробными клетками и целостным организмом по отношению к ключевой общебиологической системе окислительного фосфорилирования, локализованной в митохондриях [2, 5]. В ряде исследований показаны возможности полихроматического флуоресцентного зонда-катиона 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) как чувствительного и информативного молекулярного инструмента для исследования изменения митохондриальной активности и трансмембранных потенциалов (ТМП) в разных клетках под воздействиями *in vitro* [6-12]. В нашей предыдущей работе [12] с помощью ДСМ был выявлен токсичный эффект цитостатика циклофосфамида – снижение энергетической активности митохондрий и ТМП в лимфоцитах, изолированных из

крови. Целью данной работы является исследование *in vitro* адаптогенных и защитных свойств экстрактов из ТВ в отношении иммунных клеток в нативной крови при различных условиях и в присутствии циклофосфида на основе применения потенциал-чувствительного зонда ДСМ.

ОБЪЕКТЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В исследованиях использовали образцы донорской венозной цитратной крови (ФГУ РНЦ РР) (6 доноров). Параллельные исследования проводили на образцах свежей и суточной крови этих же доноров, последнюю в течение суток выдерживали при -2°C с целью изменения энергетического статуса клеток. Пробы каждого образца донорской крови из исходных пробирок переносили микропипетками в конусные пробирки (типа Eppendorf объёмом 1,5 мл) по 50 мкл, в которые затем последовательно добавляли испытуемые вещества и выдерживали в термостате при 37°C с экспозициями от 30-60 мин в зависимости от схемы опытов. В работе использовали образцы 40% спиртовых экстрактов из термофильных водорослей ТВ-1 и ТВ-2, полученных из двух разных гидротерм Камчатки, характеристики которых представлены в таблице 1. Экстракт из ТВ-2 исходно имеет слабую зеленую окраску, а экстракт из ТВ-1 почти бесцветный, что отражает различное содержание и (или) состояние пигментов хлорофилла в этих пробах [3,4].

В качестве токсической нагрузки на клетки крови в экспериментах использовали маточный раствор циклофосфида (Ц) в концентрации 0.02 мг/л (действующее вещество препарата «Циклофосфан»).

Для выявления защитного действия ТВ на клетки использовали следующую схему инкубаций:

$$[(10\text{мкл крови} + 1\text{мкл ТВ } (1:10^3))_{30\text{ мин } 37^{\circ}\text{C}} + 1\text{ мкл Ц } (0,02\text{ мг/л})]_{30\text{ мин } 37^{\circ}\text{C}}$$

Во все контрольные пробы крови добавляли (вместо разбавленного раствора ТВ) 40% раствор этанола, соответственно разбавленный физиологическим раствором в конечном соотношении $1:10^3$.

Согласно ранее разработанной методике [7] флуорохромирование клеток в нативной крови производили путем добавления физиологического раствора зонда ДСМ в пробирку с кровью до его конечных концентраций 10-25 мкМ с последующим перемешиванием и инкубацией при 37°C с экспозицией 30-60 мин. В работе использовали флуоресцентный зонд ДСМ [6], синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии. Опыты с каждым образцом крови проводили последовательно с интервалом в 20 мин. Для исследований нативные мазки крови приготавливали методом раздавленной капли (на стекле) [7]. Приготовленные витальные мазки крови исследовали на микроскопе-флуориметре Люмам-И2 (ЛОМО) в свете флуоресценции ДСМ. Условия возбуждения, наблюдения и регистрации флуоресценции ДСМ в клетках аналогичны, использованным в работах [6-9]. Микрофотографирование клеток осуществляли в фоторежиме с помощью фотокамеры фирмы Сапоп, закрепленной на специальном тубусе микроскопа. Для каждого образца исследовали массивы по 100 клеток в контроле и опыте. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно теории снижение энергетической активности митохондрий сопряжено с падением протонного потенциала на их мембранах [5], что приводит к изменению распределения катионов ДСМ между митохондриями, цитоплазмой и ядром [6-10,12]. При этом цвет флуоресценции зонда в митохондриях может изменяться от ярко-жёлтого до бледно-зеленого [6-9]. Одновременно снижается энергозависимый положительный градиент электрического поля на ядерной мембране [10]. В итоге катионы ДСМ проникают в ядро, и появляется оранжевая флуоресценция ДСМ, которая обусловлена связыванием катионов зонда с отрицательными полимерными структурами в ядре (ДНК и РНК) [6]. Наиболее яркая флуоресценция ДСМ в ядре возникает при достижении избыточной концентрации зонда внутри митохондрий (свыше предела его растворимости в воде), что характерно для исходно гиперактивных клеток с высокой митохондриальной активностью [6, 8, 9, 12]. Эти особенности полихроматической флуоресценции ДСМ позволяют визуально распознавать различные энергетические состояния клеток и оценивать соответствующие им ТМП согласно [8, 9, 11, 12].

Таблица 1. Видовая специфичность гидротерм Камчатки, из которых добыты образцы термофильных водорослей (ТВ1 и ТВ2)

Название гидротерм	Дебит, л/с	T, °C	Величина общей минерализации	Химический состав	Кислотность
Начикинские (ТВ1)	40	27-81	Маломинерализованные	хлоридно-сульфатные натриевые, кремнистые, азотные	слабощелочные
Малкинские (ТВ2)	30	35-83	Слабоминерализованные	гидрокарбонатно-сульфатно-хлоридные натриевые, кремнистые, азотные	слабокислотные-слабощелочные

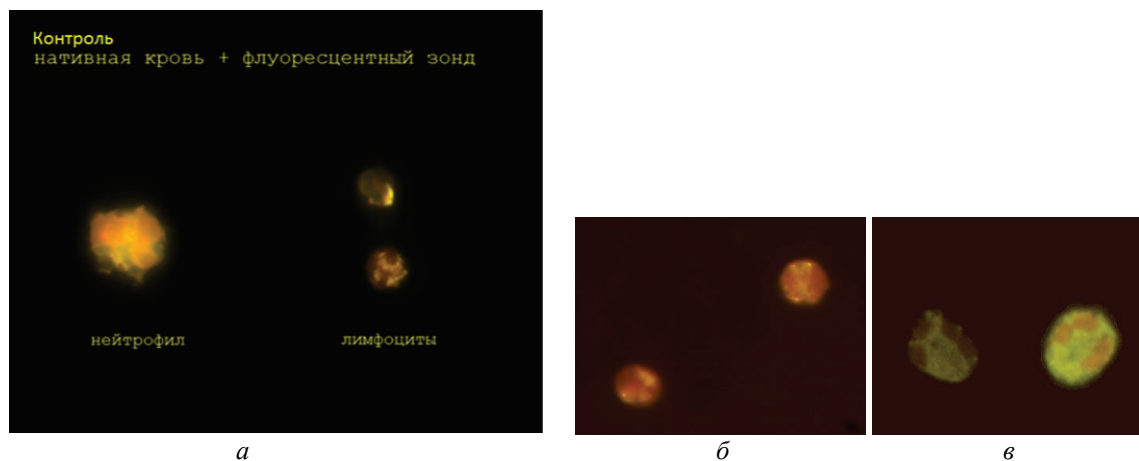


Рисунок 1. Нативная кровь в свете флуоресценции ДСМ: лимфоциты и нейтрофилы в свежей крови (а); в суточной крови после инкубации с ТВ1 (б, в). Увеличение – в 10^3 раз

В ходе люминесцентно-микроскопических исследований препаратов нативной крови установлено, что клетки в крови можно разделить по интенсивности и цвету флуоресценции ДСМ (в митохондриях и ядрах) на 4 пула соответственно диапазонам их суммарного ТМП на плазматической (ϕ_p) и митохондриальной (ϕ_{mx}) мембранах ($\phi_p + \phi_{mx}$), откалиброванных ранее путём прямого измерения суммы ТМП с помощью ДСМ согласно методу [8]. При этом, как показано в предыдущей работе [12], информативным и удобным показателем энергетической активности популяции (ЭАП) клеток является отношение между нормированными количествами (пулами) клеток с высокими и низкими значениями ТМП, а именно:

$$\text{ЭАП} = (n_1 + n_2) / (n_3 + n_4) = N_э / N_{нэ}, \quad (1)$$

где n_i – число клеток данного типа в i -м пуле, $N_э$ и $N_{нэ}$ – суммарные количество клеток в двух первых и двух последних пулах с энергизированными и слабоэнергизированными лимфоцитами (Л) или нейтрофилами (НФ) в крови соответственно.

На рисунке 1 представлены флуоресцентные изображения клеток с ДСМ в мазках нативной крови, которые демонстрируют различные энергетические состояния и уровни ТМП в клетках (Л и НФ): на фото а – слева активный НФ с высоким уровнем ТМП, справа лимфоциты с активными митохондриями (Мх), снизу активный Л с повышенным числом Мх и высоким ТМП, на фото б – гиперактивные лимфоциты после инкубации с ТВ1 имеют яркие ядра, энергизированные Мх, но часть Мх со сниженным ТМП, на фото в – слабоактивный и более активный нейтрофилы с усиленным гликолизом, видны слабоактивные зелёно-жёлтые Мх.

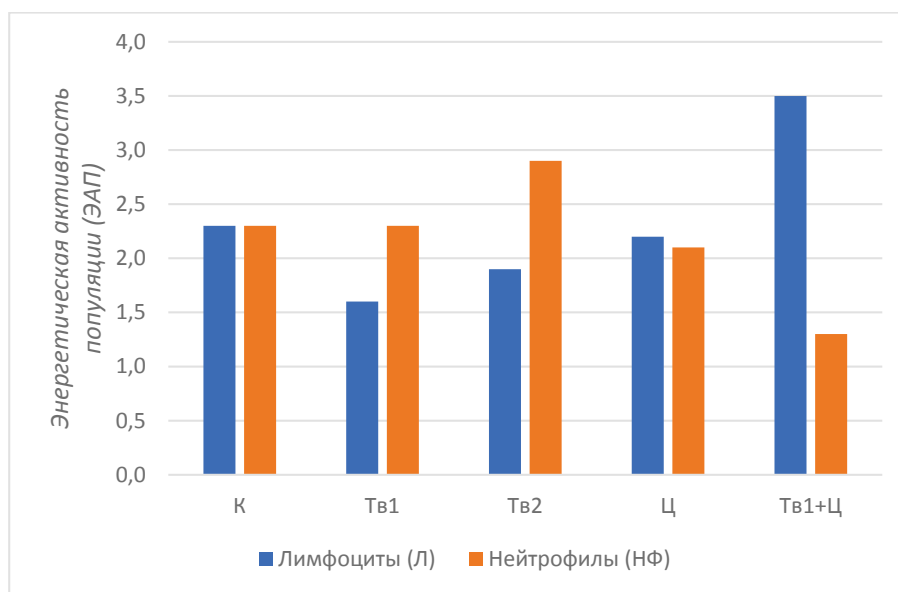


Рисунок 2. Эффекты влияния ТВ1, ТВ2 и цитостатика Ц на относительный показатель энергетический активности популяции (ЭАП) лимфоцитов и нейтрофилов в свежей донорской крови, окрашенной ДСМ. Средняя погрешность: $\pm 0,4$

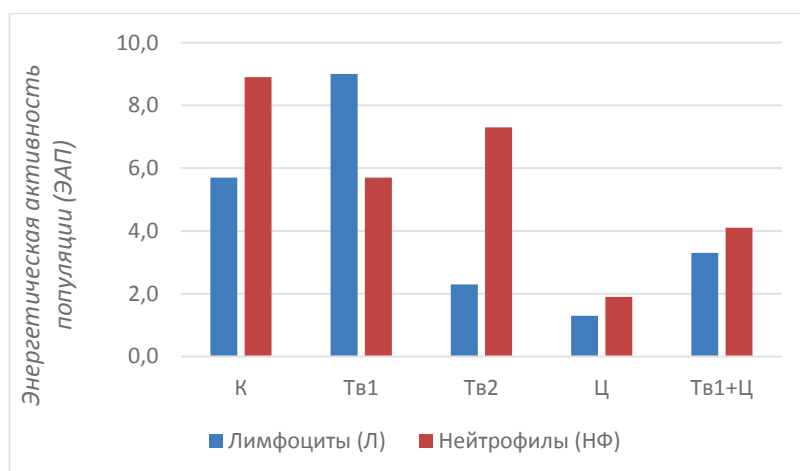


Рисунок 3. Эффекты влияния ТВ1, ТВ2 и цитостатика Ц на относительный показатель энергетической активности популяции (ЭАП) лимфоцитов и нейтрофилов в суточной крови, окрашенной ДСМ. Средняя погрешность: $\pm 0,6$.

В таблицах 2 и 3 суммированы среднестатистические данные о распределении лимфоцитов (Л) и нейтрофилов (НФ) по диапазонам суммы ТМП в образцах суточной или свежей крови на фоне воздействий ТВ и Ц, полученные с помощью зонда ДСМ аналогично [12].

Эффекты ТВ в суточной крови. Сопоставление данных таблиц 2 и 3 показывает, что в суточной крови пул высокоактивных лимфоцитов исходно существенно меньше, чем в свежей крови, но в контрольной суточной крови (К) пул высокоактивных клеток и соответственно ЭАП возрастают в несколько раз. ТВ1 в 1,5 раза увеличивает ЭАП, а ТВ2, напротив, снижает число гиперактивных Л и соответственно их ЭАП. В отличие от эффектов в лимфоцитах ТВ1 и ТВ2 достоверно снижают ЭАП НФ, причём, ТВ2 сильнее. В присутствии цитостатика Ц в 2-4 раза снижается ЭАП Л и НФ, соответственно, из-за увеличения числа клеток с деэнергизированными митохондриями. Эти изменения ЭАП в суточной крови наглядно показаны на рисунке 3. На рисунке 4 представлены результаты параллельных прямых измерений интенсивности флуоресценции ДСМ в НФ этих же образцов крови. Изменения флуоресценции ДСМ и ЭАП в этих опытах коррелируют, но ЭАП более информативен для выявления эффектов воздействий на ТМП в разных пулах клеток.

Таблица 2. Распределение лимфоцитов по диапазонам суммарного ТМП ($\Delta\phi$) на внешней ($\Delta\phi_n$) и митохондриальной ($\Delta\phi_{mx}$) мембранах и величины энергетической активности популяции (ЭАП) в свежей (нижние строки) и в суточной (верхние строки) крови в контроле и в опытах

$\Delta\phi = \Delta\phi_n + \Delta\phi_{mx}$ mV	< 60	60 -150	160 - 220	230 - 280	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
Кровь+физ.раствор.	3 ± 1	51 ± 5	45 ± 4	10 ± 2	$1,1 \pm 0,3$
% клеток	2 ± 1	18 ± 1	44 ± 4	36 ± 4	$4,1 \pm 0,5$
Контроль (К): кровь +этанол (1:10 ³), % клеток	2 ± 1	13 ± 2	44 ± 4	41 ± 4	$5,7 \pm 0,7$
	6 ± 2	24 ± 3	44 ± 4	26 ± 3	$2,3 \pm 0,3$
+ ТВ1,	2	9	41	49 ↑	↑ $9,0 \pm 1,6$
	6	32	45	17	↓ $1,6 \pm 0,2$
+ ТВ2	3	27	52	18	↓ $2,3 \pm 0,3$
	9	25	45	23	↓ $1,9 \pm 0,2$
+ Ц ,	4	42	45	9	↓ $1,3 \pm 0,2$
	4	27	42	27	↓ $2,2 \pm 0,3$
(кровь + ТВ1) + Ц,	2	22	43	36	$3,2 \pm 0,4$
	3	19	49	29	↑ $3,5 \pm 0,4$

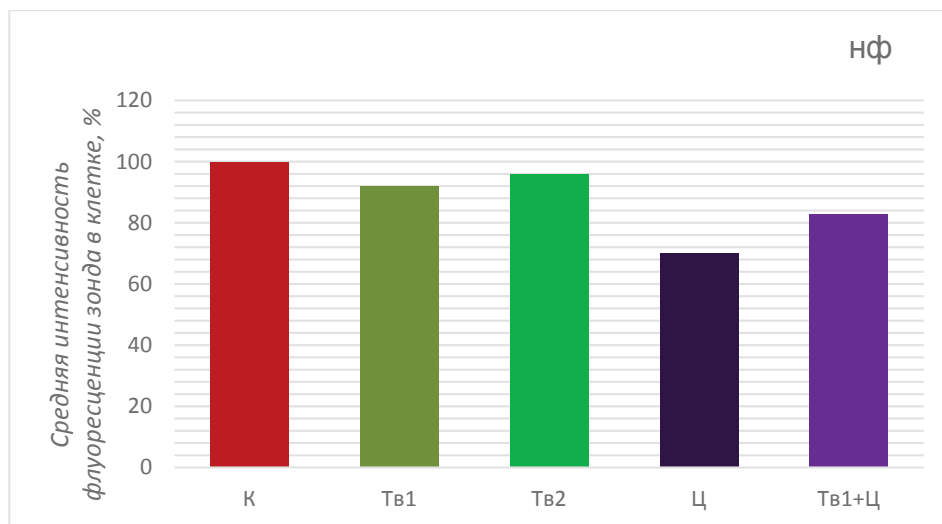


Рисунок 4. Диаграмма среднестатистических значений интенсивности флуоресценции зонда ДСМ в нейтрофилах суточной крови в контроле (К) и после инкубации крови с ТВ и цитостатиком Ц. Погрешность: $\pm 5\%$

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о противоположном характере эффектов ТВ1 и ТВ2 в лимфоцитах суточной крови. В то же время из таблиц 2 и 3 видно, что оба ТВ увеличивают 4-й пул гиперактивных НФ по сравнению с контролем, но в итоге ЭАП снижен из-за роста доли дезэнергизированных НФ в процессе переактивации.

Эффекты ТВ в свежей крови. Из данных в таблицах 2, 3 и на рисунках 2, 3 можно заключить, что в свежей крови по сравнению с суточной имеет место инверсия эффектов: ТВ1 снижает ЭАП лимфоцитов, а ТВ2 увеличивает ЭАП нейтрофилов. Анализ этих данных указывает в пользу адаптивного влияния ТВ на клетки в свежей крови: гиперактивные клетки частично переходят в пул 3 с нормальным уровнем ТМП. В опытах с цитостатиком Ц на свежей крови выявлен слабый эффект снижения энергетики митохондрий. Но при этом обнаружен эффект синергетического усиления ЭАП Л при совместном действии ТВ1 и Ц. Аналогичного эффекта на ЭАП НФ в этих пробах крови не обнаружено.

Сравнивая эффекты в опытах на разных пробах крови, можно заключить, что для серии проб суточной крови исходный показатель ЭАП НФ (кровь + ф.р.) оказывается существенно выше, чем для ЭАП НФ в свежей крови этой серии, а для ЭАП Л наоборот. Возможно, предварительная инкубация крови 24 ч при низкой температуре

Таблица 3. Распределение нейтрофилов по диапазонам ТМП ($\Delta\phi$) на внешней ($\Delta\phi_n$) и митохондриальной ($\Delta\phi_{mx}$) мембранах и величины энергетической активности популяции (ЭАП) в свежей (нижние строки) и суточной крови (верхние строки) в контроле и в опытах

$\Delta\phi = \Delta\phi_n + \Delta\phi_{mx}$ mV	60 - 180	190 - 220	230 - 260	270 - 320	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
Кровь + физ. раствор, % клеток	2 ± 1 4 ± 1	9 ± 2 22 ± 2	32 ± 3 53 ± 5	57 ± 5 21 ± 2	$8,1 \pm 1,5$ $2,8 \pm 0,5$
Контроль (К): кровь + этанол ($1:10^3$), % клеток	2 ± 1 6 ± 1	9 ± 1 24 ± 3	34 ± 3 33 ± 3	55 ± 5 37 ± 4	$8,9 \pm 1,5$ $2,3 \pm 0,3$
+ ТВ1	6 6	9 27	21 45	64 22	$\downarrow 5,7 \pm 0,9$ $2,3 \pm 0,3$
+ ТВ2	3 5	9 21	19 53	69 21	$\downarrow 7,3 \pm 1,4$ $\uparrow 2,9 \pm 0,3$
+ Ц	15 5	19 27	52 27	14 41	$\downarrow 1,9 \pm 0,2$ $\downarrow 2,1 \pm 0,3$
(кровь + ТВ1) + Ц	6 12	14 32	35 38	45 18	$\uparrow 4,1 \pm 0,5$ $\downarrow 1,3 \pm 0,2$

приводит к усилению гликолитической активности НФ и к росту их внешнего ТМП [11,15], что соответствует стрессовому состоянию этих клеток. Напротив, митохондрии в лимфоцитах лучше сохраняются на холоду и восстанавливают протонный потенциал после инкубации при физиологической температуре. Важно также отметить, что во всех контрольных пробах с добавлением микродозы этанола, наблюдается инверсия исходного энергетического статуса клеток, что фактически отражает регуляторный эффект этанола, по-видимому, через механизм изменения проницаемости мембран для ионов в клетках [15]. Тем не менее на этом фоне (К) выявлены достоверные эффекты влияния Ц и разбавленных спиртовых экстрактов из ТВ на иммунные клетки.

Сопоставление наших данных указывает в пользу того, что защитное действие ТВ1 на энергетику клеток в крови в присутствии Ц может быть обусловлено не столько хлорофиллом, сколько другими компонентами (например, повышенным содержанием пигментов каротиноидов). Низкое содержание хлорофилла в ТВ1 по сравнению с ТВ2 – следствие особенностей слабощелочной среды Начикинских гидротерм, откуда добыты образцы ТВ1 [3.4]. Хлорофилл *a* в ТВ2 может быть основным фактором, модулирующим энергетический баланс митохондрий, например, на фоне усиления гликолиза в НФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о способности экстракта из ТВ1 снижать токсическое воздействие низкой дозы (0.02 мг/л) циклофосамида на энергетику лимфоцитов и нейтрофилов в крови. Онаруженная инверсия эффектов ТВ в наших опытах указывает на проявление адаптогенных свойств экстрактов ТВ1 и ТВ2 в отношении иммунных клеток в крови, поскольку эти эффекты зависят от их исходного энергетического статуса. Избыточная стимуляция исходно активных лимфоцитов в крови под влиянием ТВ может приводить к снижению ЭАП клеток и наоборот. В то же время нельзя исключить, что эти эффекты ТВ связаны с влиянием и на процессы взаимодействия между субпопуляциями лимфоцитов и нейтрофилов через лимфокины, интерлейкины и другие медиаторы в такой сложной системе как кровь, а также возможное влияние ТВ на мембраны эритроцитов и белки плазмы, сопряженные с оксигенацией крови [7]. Для уточнения механизмов адаптогенной и защитной активностей экстрактов из ТВ на клетки в нативной крови необходимы дальнейшие специальные исследования взаимодействия пигментов, выделенных из ТВ, с разными форменными элементами крови и с изолированными иммунными клетками.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-17-0067).

Список литературы / References:

1. Barenboym G.M., Kozlova M.A. Pollution of Sources of Drinking Water Supply of Large Cities with Pharmaceuticals (the Example of Moscow, Russia). *Water Resources*, 2018, vol. 45, no. 6, pp. 925-936.
2. Баренбойм Г.М., Маленков А.Г. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска. М.: «ACADEMIA», 2012, т. 6, с. 77-386. [Barenboym G.M., Malenkov A.G. *Biologically active substances. New principles of search*. M.: Publishing House "ACADEMIA", 2012, vol. 6, pp. 77-368. (In Russ.)]
3. Акшинцев А.А. Некоторые особенности обитания биоты в гидротермах Камчатки. *Актуальные проблемы экологии и природопользования*. М.: РУДН, 2013, вып. 15, с. 39-44. [Akshintsev A.A. Some features of biota habitat in Kamchatka hydrotherms. *Aktualnye problemy ekologii i prirodopolzovaniya*. Moscow: RUDN, 2013, iss. 15, pp. 39-44. (In Russ.)]
4. Акшинцев А.А., Баренбойм Г.М., Кириченко В.Е., Никитина В.Н., Чернягина О.А. Об адаптогенных свойствах экстрактов и индивидуальных веществ, выделенных из термофильных гидробионтов Камчатки. *Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей, Петропавловск-Камчатский*. Изд.: «Камчатпресс», 2014, с. 13-25. [Akshintsev A.A., Barenboyim G.M., Kirichenko V.E., Nikitina V.N., Chernyagina O.A. Adaptogenic properties of extracts and individual substances isolated from Kamchatkathermohylic hidrobionts. *Sokhranenie bioraznoobraziya Kamchatki i prilegayushih morej, Petropavlovsk-Kamchatskij*. Ed. Kamchatpress, 2014, pp. 13-25. (In Russ.)]
5. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V.P. *Energy of biological membranes*. M.: Science, 1989, 123 p. (In Russ.)]
6. Морозова Г.И., Добрецов Г.Е., Дубуре Р.Р., Дубур Г.Я., Голицын В.М., Владимиров Ю.А. Флуоресценция зонда 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке. *Цитология*, 1981, т. 23, № 8, с. 916-923. [Morozova G.I., Dobretsov G.E., Dubur R.R., Dubur G.Ya., Golitsyn V.M., Vladimirov Yu.A. Fluorescence of 4-(*n*-dimethylaminostyryl) -1-methylpyridinium probe in a living cell. *Cytology*, 1981, vol. 23, no. 8, pp. 916-923. (In Russ.)]
7. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И.Г., Коробкова Е. Н., Полосина О.В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, стр. 43-47. [Morozova G.I., Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Bazyeva F.H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematal. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, pp. 43-47. (In Russ.)]
8. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда - катиона ДСМ на цитоплазматической и

митохондриальной мембранах. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273. [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu.A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe - cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266-273. (In Russ.)]

9. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating effect of erythropoietin on thy timocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. *Biochem. Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.

10. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. *Сборник докладов 2-го съезда биофизиков России*. М.: 1999, с. 256-257. [Morozova G.I., Poletaev A.I., Borshevskaya T.A. Inverted electrochemical potential on the nuclear membrane of cells and its relationship with cellular energy. *Reports of the 2nd Russia biophysicists Congress*. М.: 1999, pp. 256-257. (In Russ.)]

11. Toshakov V.G., Morozova G.I., Onishchenko N.A. Energy metabolism of cryoprevred rad hehatocytes. *Cryoletters*, 1991, no. 12, pp. 259-272.

12. Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А. Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 3, с. 428-424. [Morozova G.I., Kozlova M.A., Akshintsev A.A. Evaluation of the ecological toxicity of aqueous solutions with low xenobiotics doses on donor blood cells using a potential-seneitive fluorescent probe. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 428-424. (In Russ.)]

13. Забродский П.Ф., Теректук Т.С., Плахута И.А., Серов В.В. Особенности фармакологической регуляции нарушений иммунного ответа, обусловленных применением циклофосфамида. *Вестник Волгоградского ГМУ*, т. 21, № 1, с. 39-41. [Zabrodskii P.F., Terentyuk T.S., Plakhuta I.A., Serov V.V. Peculiarities of pharmacological regulation of the immune response violations resulting from the application of cyclophosphamide. *Vestnik Volgograd. GMU*, vol. 21, no. 1, pp. 39-41. (In Russ.)]

14. Бейли И.Н. *Статистические методы в биологии*. М.: Наука, 1963, 277 с. [Bailey I.N. *Statistical methods in biology*. М.: Science, 1963, 277 p. (In Russ.)]

15. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. *Физические механизмы функционирования биологических мембран*. М: МГУ, 1987, 187 с. [Tverdislov V.A., Tikhonov A.N., Yakovenko L.V. *Physical mechanisms of biological membranes functioning*. М: Moscow State University, 1987, 187 p. (In Russ.)]

DETECTION OF ADAPTOGENIC AND PROTECTIVE OF THERMOPHILIC ALGAE EXTRACTS EFFECTS ON LEUKOCYTE ENERGY STATUS IN NATIVE BLOOD USING A POTENTIAL-SENSITIVE FLUORESCENT PROBE DSM

Akshintsev A.A.¹, Morozova G.I.², Kozlova M.A.¹, Barenboym G.M.¹

¹ Russian Peoples' Friendship University,
st. Miklukho-Maklay, 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: gimorozova@mail.ru

² Water Problems Institute of RAS,
st. Gubkina, 3, Moscow, 19991, Russia; e-mail: mblshok@mail.ru

Abstract. The search for natural adaptogens that can stabilize the energy balance of cells against the background of drugs low doses which pollute water is relevant. The aim of the work is to identify the protective effect of thermophilic blue-green algae (TA1 and TA2) extracted from two of Kamchatka's hydrothermal waters on native blood cells. By use of the microscope-microfluorimeter, lymphocytes (L) and neutrophils (N) were detected in donor venous native blood smears. Then the sum of the transmembrane potentials (TMP) on the outer and mitochondrial membranes was estimated from the fluorescence intensity and color of the polychromatic cationic probe 4- (n- dimethylaminostyryl) - 1-methylpyridinium (DSM). The ratio between cell pools with low and high TMPs in L or N populations were used as an indicator of the cell population energy activity (EAP). During in vitro tests of TA on control blood samples, an increase in mitochondrial activity in L was detected, but a decrease in TMP in N was observed. The analysis of the experimental data revealed a significant decrease in the EAP after the blood pre-incubation with the Cyclophosphamide (C) (0.002 mg / l) at 37°C. It is established that the TA1 (unlike TA2) causes a partial EAP restoration for L and reduces the C toxic effect on the mitochondria. From a comparison of the data obtained, it follows that these TBs exhibit adaptogenic activity in the blood, since their effects depend on the initial immune cells activity in fresh and daily blood samples.

Key words: thermophilic algae, adaptation, fluorescent probe DSM, native blood, lymphocytes, neutrophils, transmembrane potential, mitochondrial activity, cyclophosphamide.

ЧАСТОТНО-ВРЕМЕННОЙ АНАЛИЗ ПОДВОДНЫХ ЗВУКОВ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. УСАТЫЕ КИТЫ

Лисютин В.А., Ластовенко О.Р., Дегтяр А.Д., Ярошенко А.А., Петренко Н.В.,
Лучин В.Л., Рыбакова К.А., Папков С.О.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 18.07.2020

Аннотация. Освоение шельфовых районов моря приводит к вмешательству человека в сложившиеся экосистемы и ставит под угрозу жизнь морских млекопитающих. Изучение, анализ и систематизация звуков китообразных может дать возможность идентификации вида и количества особей. С другой стороны, киты являются излучателями самых низкочастотных звуков в волноводе. Если известно расположение источника и приемника, частотно-временной анализ звукового поля может быть использован для инверсии акустических свойств морского дна. В работе приводится обзор видов морских млекопитающих – усатых китов и излучаемых типов высокочастотных и низкочастотных звуков. Проводится частотно-временной анализ излучаемых усатыми китами звуков. Результаты представляются в виде временных реализаций и спектрограмм. Показывается, что волноводные условия распространения звука вносят специфические дисперсионные искажения. Между излученным и зарегистрированным с помощью гидрофона звуком может быть большая разница. Показывается принципиальная возможность использования низкочастотных звуков млекопитающих для решения задач инверсии акустических свойств морского дна.

Ключевые слова: звуки морских млекопитающих, дисперсия фазовой скорости, дисперсионные искажения, нормальные волны, частотно-временной анализ.

Введение.

Морские млекопитающие распространены по всем океанам и вносят значительный вклад в подводный звуковой фон [1]. Изучение подводных звуковых ландшафтов является растущей областью исследований, востребованной с точки зрения экологии, подводной навигации, военных применений [2].

Морские млекопитающие эволюционировали так, чтобы использовать звук в качестве основного сенсорного механизма как активного (излучение звука), так и пассивного (прием звука). Так сложилось потому, что звук распространяется под водой с меньшими потерями и на большие расстояния, чем свет. Морские млекопитающие производят звук для общения. Зубатые киты также издают эхолокационные щелчки во время кормления и с целью навигации. В то время как вокализация морских млекопитающих производится гортанью, эхолокационные щелчки издаются расположенными в носовой полости воздушными мешочками [1].

Данная статья является обзорной, в значительной степени основанной на анализе открытых иностранных источников [1, 3]. Записи звуков взяты в основном с сайта [3].

Усатые Киты (Baleen Whales).

На рисунке 1 показаны китообразные: 1 – Южный кит (*Eubalaena australis*—**Southern Right Whale**); 2 – Карликовый южный кит (*Caperea marginata*—**Pygmy Right Whale**); 3 – Малый или остромордый полосатик (*Balaenoptera acutorostrata*—**Common Minke Whale**); 4 – Антарктический малый полосатик (*Balaenoptera bonaerensis*—**Antarctic Minke Whale, Dark-shoulder Minke Whale**); 5 – Сейвал (*Balaenoptera borealis*—**Sei Whale**); 6 – Полосатик Брайда (*Balaenoptera edeni*—**Bryde's Whale**); 7 – Синий кит (*Balaenoptera musculus*—**Blue Whale**); 8 – Полосатик Омуры (*Balaenoptera omurai*—**Omura's Whale**); 9 – Финвал – сельдяной кит (*Balaenoptera physalus*—**Fin Whale**); 10 – Горбатый кит (*Megaptera novaeangliae*—**Humpback Whale**).

Южный кит (*Eubalaena australis*—**Southern Right Whale**). Взрослые особи достигают длины от 11 до 18 метров и веса от 54 до 73 тонн. Тела очень широкие, в обхвате достигают 10 метров. Имеют 200-300 пластин китового уса с каждой стороны рта, длина которых составляет до 2 метров. Хвостовой плавник имеет размах до 7 метров. Спинной плавник отсутствует.

Карликовый южный кит (*Caperea marginata*—**Pygmy Right Whale**). Длина взрослой особи – 5,5-6,5 м, вес – от 3 до 3,5 тонн. Далеко от центральной части спины расположен спинной плавник. Имеет обтекаемую форму тела. По 230-260 пластин китового уса в каждом ряду и достигают до 70 см в длину. Размах хвостовых лопастей до 2 метров.

Малый или остромордый полосатик (*Balaenoptera acutorostrata*—**Common Minke Whale**). В длину достигает до 10 метров. Спинной плавник до 35 см высотой, с глубокой вырезкой по заднему краю, располагается ближе к хвостовой лопасти. Совершенно обтекаемое тело. Треугольная голова с 2 отчетливыми отверстиями дыхания и острой мордой. Китовый ус не выше 25 сантиметров, по 270-330 пластин в каждом ряду.

Антарктический малый полосатик (*Balaenoptera bonaerensis*—**Antarctic Minke Whale, Dark-shoulder Minke Whale**). Самки немного длиннее самцов и достигают 12 метров. Вес в среднем составляет 11 тонн. Спинной плавник имеет форму крючка и расположен примерно на две трети длины тела спереди. От 160 до 415 пар пластины китового уса имеют длину до 27 сантиметров.

Сейвал (*Balaenoptera borealis*—**Sei Whale**). Длина взрослой особи – 12-16 метров с весом 20-30 тонн. Пластины китового уса серо-черного цвета с более бледной бахромой, по 300-400 пар, высота пластин около 80 см. Спинной плавник серповидный, более высокий, чем у других полосатиков, расположение далеко за центром.

Полосатик Брайда (*Balaenoptera edeni* – **Bryde's Whale**). Тело полосатика вытянутое, длинное и гладкое. Длина до 15 метров, вес 20 тонн. Телосложением и окрасом полосатик Брайда напоминает сейвала, но в среднем на 1,2-1,5 м меньше его и стройнее. Основные отличия от сейвала – наличие на верхней части головы трех продольных гребней. Спинной плавник достигает в высоту лишь 2,0 - 2,4% длины тела, серпообразной формы, расположен далеко сзади. В одном ряду усовых пластин 250 - 280 высотой 20 - 25 сантиметров, не считая стержневидных образований в передней части ряда.

Синий кит (*Balaenoptera musculus*—**Blue Whale**). Наиболее крупный представитель отряда китообразных и всего класса млекопитающих. У синего кита язык весит 3 т, печень – 1 т, сердце – 600-700 кг, крови у него – 10 т, диаметр спинной артерии – 40 см, в желудке – 1-2 т пищи; пасть кита - комната площадью 24 м². Длина взрослого – 24-33 м (самки крупнее). Вес взрослого – 100-120 тонн. Пластины китового уса и бахрома смолянисто-черные, треугольные. Бахрома толстая, грубая – 40-45 мм. Высота не превышает 130 см, ширина 50-60 см, их число 270-440 в каждой половине верхней челюсти (в среднем 360).

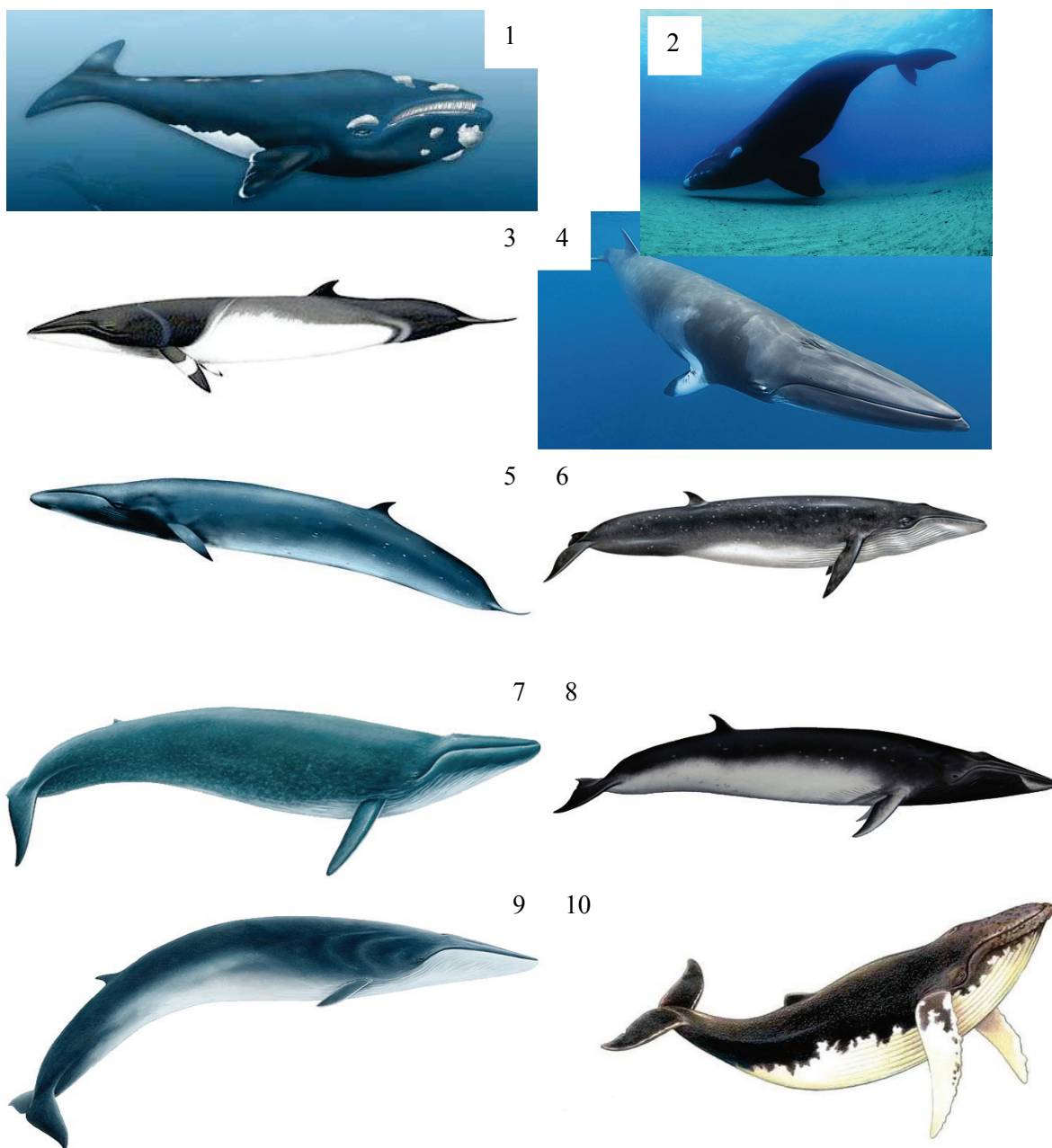


Рисунок 1. Усатые киты

Полосатик Омур (*Balaenoptera omurai*—**Omura's Whale**). Этот подвид является одним из самых маленьких из полосатиков. Его длина достигает 10-11 метров. Внешне они очень напоминают полосатиков Брайда, однако отличаются от них четкими темными и светлыми отметинами на голове и челюсти. Выделен как самостоятельный вид только в 2003 году в результате молекулярно-генетических исследований.

Сельдяной кит (*Balaenoptera physalus*—**Fin Whale**). Тело стройное вытянутое, в передней части в сечении округлое. Голова маленькая (не более 25% от длины тела), вершина сглаженная. Финвал - второй по величине полосатик. Крупнейшие особи: в южном полушарии самки 27,3 м, самцы 24,4 м, а в северном — самки 24,6 м и самцы 23,8 м. Средняя длина южных самок (Антарктика) 21,0 м и самцов — 20 м, а северных — самок 19,4 м и самцов — 18,6 м. Вес взрослого - 30-80 тонн. Количество пластин китового уса в среднем 360 в каждом ряду, длиной до 90 см.

Горбатый кит (*Megaptera novaeangliae*—**Humpback Whale**). Один из самых энергичных среди больших китов, горбатый кит хорошо известен эффектными зрелищами выпрыгивания из воды, выставление хвоста и хлопанье плавниками. Он также один из наиболее легко определяемых китов. В среднем длина взрослой особи — 11,5-18 м, при весе 25-30 тонн. Тело утолщенное и короткое. Грудные плавники очень большие. Спинной плавник в виде горба, толстый, сравнительно низкий, задний край его крутой. В одном ряду китового уса 270-400 пластин, до 100 см.

Частотно-временной анализ звуков.

Южный кит (*Eubalaena australis*—**Southern Right Whale**). Все популяции издают частотно-модулированные звуки в диапазоне от 30 до 500 Гц, гармоники до 5 кГц и длительностью 0,2-3,8 с. Они также издают тональные звуки в диапазоне от 30 до 500 Гц и гармоники до 3,5 кГц, длительностью 0,2-6 с. Импульсные звуки длятся 0,2-6,3 с энергией, сосредоточенной в полосе частот от 30 Гц до 3 кГц. Наконец, Южные киты также излучают короткие широкополосные импульсы (30-8400 Гц), называемые "выстрелами" с уровнями источника 172-187 дБ и длительность 0,1-0,4 с [1].

Пример частотно модулированного звука показан на рисунке 2. Исходный звуковой файл имеет частоту дискретизации 12 кГц и записан со значительными шумами моря, для устранения которых он был подвергнут низкочастотной фильтрации. Звук с частотной модуляцией от 90 Гц до 200 Гц и плавно нарастающей амплитудой имеет длительность 2,5 с и воспринимается как «у – ууу» с нарастающей частотой. Второй тональный звук длительностью свыше 4 с слышится как утробный рев – урчание с переменной амплитудой. Высокая частота дискретизации обоих сигналов препятствуют их детальному частотному анализу.

Карликовый южный кит (*Caperea marginata*—**Pygmy Right Whale**). В настоящее время опубликована всего одна статья по вопросу акустики карликовых южных китов, описывающая частотно-модулированные звуки с частотой от 200 до 50 Гц, длительностью 0,3 с. Временная реализация звука показана на рисунке 3. Частота дискретизации при записи этого сигнала соответствует высококачественному звуковоспроизведению – 44100 Гц,

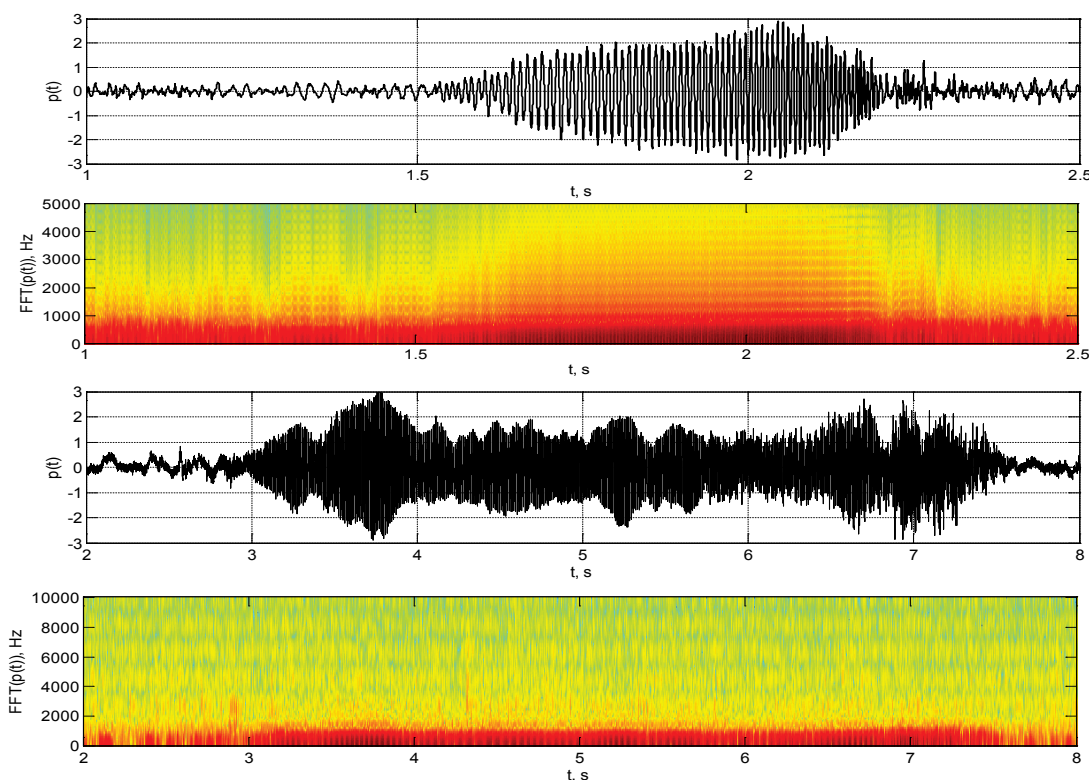


Рисунок 2. Частотно модулированный (верхняя панель) и тональный (нижняя панель) звуки южного кита

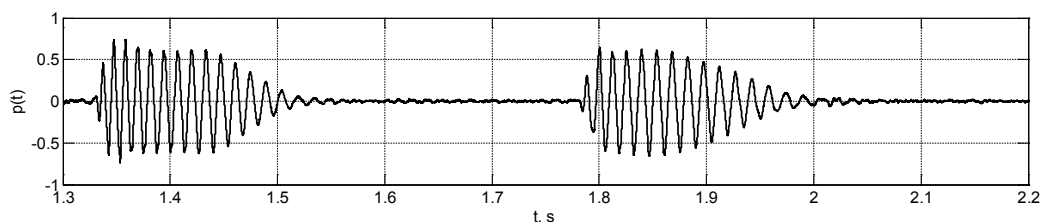


Рисунок 3. Реализация звука карликового южного кита

и поэтому спектрограмма имеет очень низкое разрешение по частоте и не приведена. Почти тональные короткие импульсы длительностью 0,2 с частотой 71 Гц (определено по периоду на реализации) воспринимаются на слух как щипки демпфированной струны бас-гитары. Отметим, что нам совершенно неизвестны условия, в которых записаны приведенные сигналы. Как видно из рисунка 1, некоторые киты сфотографированы в условиях мелкого моря, видны песчаное дно и поверхность моря. Условия распространения звука в мелком море – особые. Мелкое море представляет собой волновод, ограниченный снизу дном, имеющим сложные акустические свойства, сверху – абсолютно отражающей свободной поверхностью. Вследствие многомодового характера распространения звука и внутримодовой дисперсии звуки, распространяющиеся в таком волноводе, искажаются [4-10].

Как следствие, зарегистрированный гидрофоном сигнал и исходный звук, излученный морским млекопитающим могут значительно отличаться.

Малый или остромордый полосатик (*Balaenoptera acutorostrata*—**Common Minke Whale**). В основном издают импульсные звуки, которые скомпонованы в каналы, которые имеют либо постоянный импульс частоты повторения, либо ускоряется, либо замедляется. Диапазон частот – 10-800 Гц. Импульсы имеют длительность 0,04-0,3 с; 1,5-4,5 импульса происходят в секунду, в каналах длительностью 10-70 с, и с исходными уровнями 159-176 дБ. Сообщалось, что остромордые полосатики издают звук «Боинг». «Боинг» - это амплитудно-модулированный звук, часто описываемый как последовательность быстрых импульсов, охватывает полосу частот 1-5 кГц, длится 1,4-4,2 с и показывает около 112-118 импульсов/с, на источнике уровень около 150 дБ. Временная реализация и спектрограмма звука «Боинг» показана на рисунке 4.

На слух этот звук удивительно напоминает вибрирующую металлическую линейку, наполовину прижатую одним концом к плоскости стола, а вторым концом – свободно свешивающуюся со стола. Как видно из реализации и спектрограммы, «металлические удары свободного конца линейки» - это импульсы с частотой 1 и 1,5 кГц, накладывающиеся на более низкочастотный рокот 300 Гц трения линейки о деревянный стол. В самом начале спектрограммы можно увидеть вступления модовых импульсов, возбужденных переходным процессом включения звукового сигнала.

Антарктический малый полосатик (*Balaenoptera bonaerensis*—**Antarctic Minke Whale, Dark-shoulder Minke Whale**). В Антарктиде частотно-модулированные звуки наблюдались с частотой 60-140 Гц, происходящие с гармониками и без них, с длительностью $0,2 \pm 0,1$ с и громкостью $147,3 \pm 5,3$ дБ. Они также испускают быстрые широкополосные импульсы, звучащие как утиное кряканье (звук назван "bioduck"). В "bioduck" звук содержит 5-12 импульсов длительностью 0,1-0,4 с интервалом 1-3 с и громкостью $140,2 \pm 3,6$ дБ. Этот звук показан на рисунке 5.

С точки зрения слушателя, этот звук мало похож на кряканье, а скорее напоминает низкочастотное (200-100 Гц) «уханье». Отметим, что частотная модуляция может быть и не обязательно биологического происхождения. Спектрограмма этого звука удивительно совпадает со спектрограммой вступления мод, распространяющихся в волноводе мелкого моря, когда излучается шумоподобный импульс в узком диапазоне частот.

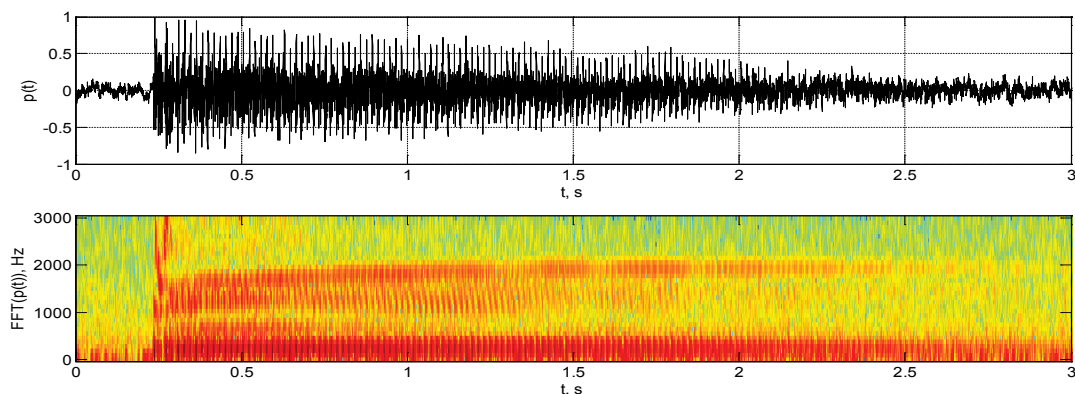


Рисунок 4. Звук «Боинг» остромордого полосатика

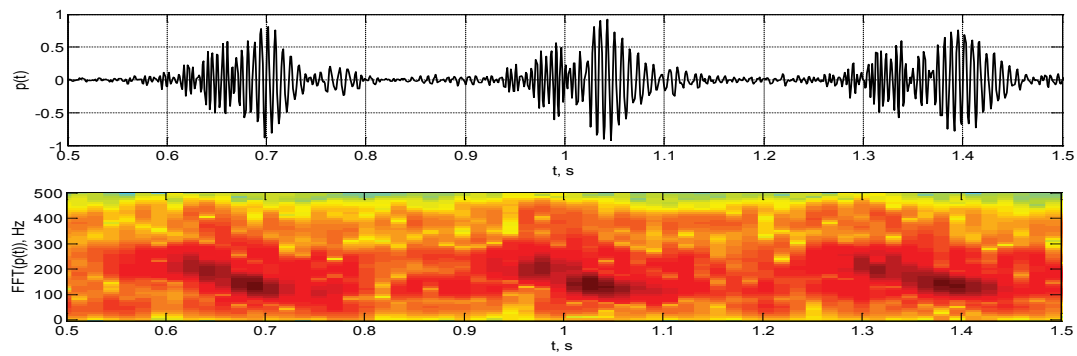


Рисунок 5. Кряканье антарктического малого полосатика

Сейвал (*Balaenoptera borealis*—**Sei Whale**). Сейвалы издают 0,5-2-с звуки с частотой 200-500 Гц, без или с высокочастотными гармониками, в том числе многочастотные тональные звуки. Наиболее часто, встречающиеся сообщаемые звуки – это простые частотно модулированные звуки: восходящие и нисходящие, длящиеся 0,7-2,2 с, в низкочастотном диапазоне 20-220 Гц или среднечастотном диапазоне 200-600 Гц.

Полосатик Брайда (*Balaenoptera edeni* – **Bryde's Whale**). Киты Брайда издают 0,3-7-с CW звуки при частоте 8-80 Гц с и без высоких гармоник. Они также издают частотно модулированные звуки, в основном нисходящие (50-1000 Гц, 0,1-5 с, 141-174 дБ) с гармониками и без них, иногда встречающимися в последовательностях 2-25 нисходящих волн. Киты также издают звуки, которые были описаны как "стоны" или быстрые серии импульсов с частотой 83-950 Гц, длительностью 0,3-51 с, 10-130 импульсов/с.

Синий кит (*Balaenoptera musculus*—**Blue Whale**). Могут издавать тональные, частотно модулированные или импульсные звуки, охватывающие полосу частот 14-300 Гц, от 0,9 до 4,4 с, гармониками до 100 Гц и громкостью 168-181 дБ. На рисунке 6 показана реализация крайне низкочастотного звука (не воспроизводится бытовой аппаратурой), продолжительностью $9,2 \pm 0,92$ с, производимых каждые 134-177 с. Похожие звуки с частотой 20-60 Гц, 12-15 с, повторяющиеся каждые 160-210 с часто регистрируются на северо-западном шельфе Австралии и одновременные визуальные наблюдения и фотографии подтвердили присутствие китов Омуры.

Полосатик Омуры (*Balaenoptera omurai*—**Omura's Whale**). Низкочастотные (15-50 Гц) звуки со средней продолжительностью $9,2 \pm 0,92$ с, производимых каждые 134-177 с. Похожие звуки с частотой 20-60 Гц, 12-15 с, повторяющиеся каждые 160 - 210 с часто регистрируются на северо-западном шельфе Австралии и одновременные визуальные наблюдения и фотографии подтвердили присутствие китов Омуры.

Сельдяной кит (*Balaenoptera physalus*—**Fin Whale**). Финвалы издают звуки, организованные в «песню», длящуюся в течение многих часов, состоящую из посылок с межимпульсным интервалом 5-26 с. Они также издают высокочастотные частотно модулированные звуки длительностью до 5 с, амплитудно модулированный «грохот» на частоте 10-30 Гц и продолжительностью до 30 с, амплитудно модулированные «стоны» до 100 Гц, длительностью 2 с и уровнем 159-183 дБ. Фрагмент песни представлен в виде реализации и спектрограммы на рисунке 7. При прослушивании звуки ощущаются как утробные «у» с неразборчивой модуляцией.

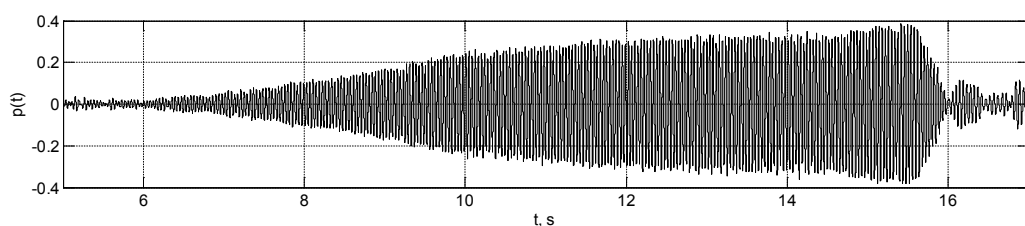


Рисунок 6. Рев синего кита

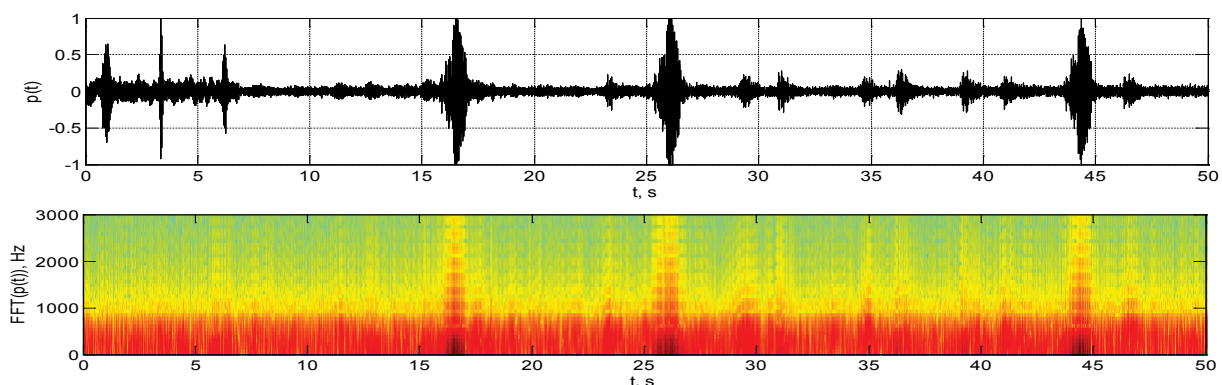


Рисунок 7. Песня финвала

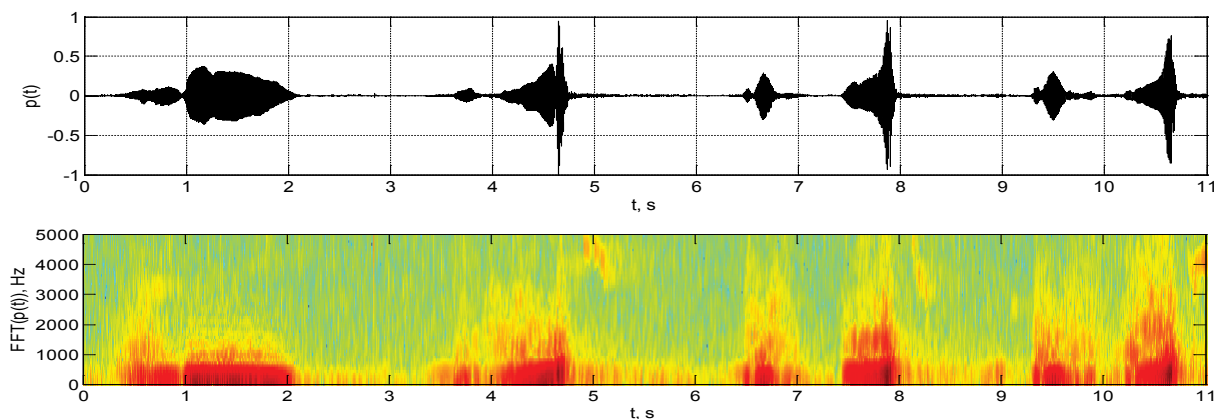


Рисунок 8. Песня горбатого кита

Горбатый кит (*Megaptera novaeangliae*—**Humpback Whale**). Песня состоит из 0,2-4 с блоков, сгруппированных в фразы, которые сгруппированы в темы. Полоса частот песни с обертонами может быть от 20 Гц до 24 кГц, громкостью 151-189 дБ. Громкость всех типов социальных звуков варьируются от 123 до 192 дБ. Песня горбатого кита показана на рисунке 8.

Субъективно песня воспринимается буквально как мычание коровы (низкочастотные компоненты на спектрограмме), смешанное с присвистами попугая (высокочастотные компоненты).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Освоение шельфовых районов моря приводит к вмешательству человека в сложившиеся экосистемы и ставит под угрозу жизнь морских млекопитающих. Изучение, анализ и систематизация звуков китообразных может дать возможность идентификации вида и количества особей [2]. С другой стороны, киты являются излучателями самых низкочастотных звуков в волноводе. Если известно расположение источника и приемника, частотно-временной анализ звукового поля может быть использован для инверсии акустических свойств морского дна [5, 9].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и города Севастополь в рамках научного проекта № 18-42-920001.

Список литературы / References:

1. Erbe C., Dunlop R., Jenner K.C., Jenner M.-N.M., McCauley R.D., et al. Review of Underwater and In-Air Sounds Emitted by Australian and Antarctic Marine Mammals. *Acoustic Australia*, 2017, vol. 45, pp. 179-241.
2. Григорьев В.А., Луньков А.А., Петников В.Г., Шатравин А.В. Оценка возможностей идентификации Гренландских китов на арктическом шельфе. *Акустический журнал*, 2019, т. 65, № 5, с. 596-607. [Grigoriev V.A., Lunkov A.A., Petnikov V.G., Shatravin A.V. Assessing the Possibilities of Identifying Bowhead Whales on the Arctic Shelf. *Acoustical Physics*, 2019, vol. 65, no 5, pp. 495-506. (In Russ.)]
3. <https://cmst.curtin.edu.au/research/marine-mammal-bioacoustics/> (date of assess 28.07.2020)
4. Лисютин В.А. Простая акустическая модель неконсолидированных морских осадков с внутренним и вязким трением. *Экологический вестник научных центров ЧЭС*, 2018, т. 15, № 3, с. 39-51. DOI: 10.31429/vestnik-15-3-39-51. [Lisyutin V.A. A Simple Acoustic Model of Unconsolidated Marine Sediments with Internal Friction and Viscous Dissipation. *Ecological Bulletin of Research Centers of the Black Sea Economic Cooperation*, 2018, vol. 15 (3), pp. 39-51. DOI: 10.31429/vestnik-15-3-39-51. (In Russ.)]
5. Лисютин В.А. Обобщенная реологическая модель неконсолидированных морских осадков с внутренним трением и эффективной сжимаемостью. *Морской гидрофизический журнал*, 2019, т. 35, № 1, с. 85-100. DOI: 10.22449/0233-7584-2019-1-85-100. [Lisyutin V.A. Generalized Rheological Model of the Unconsolidated Marine Sediments with Internal Friction and Effective Compressibility. *Physical Oceanography, e-journal*, 2019, vol. 26 (1), pp. 77-91. DOI: 10.22449/1573-160X-2019-1-77-91. (In Russ.)]
6. Katsnelson B., Petnikov V., Lynch J. *Fundamentals of Shallow Water Acoustics*. New York: Springer, 2012, 540 p. (Underwater Acoustics. Eds. J.A. Simmen et al.). DOI: 10.22449/0233-7584-2016-1-62-72.
7. Wan L., Badiy M., Knobles D.P. Geoacoustic inversion using low frequency broadband measurements from L-shaped arrays in the Shallow Water 2006 Experiment. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 2016, vol. 140, no. 4, pp. 2358-2373.
8. Thode A., Bonnel J., Thieury M., Fagan A., Verlinden C. et al. Using nonlinear time warping to estimate North Pacific right whale calling depths. in the Bering Sea. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 2017, vol. 141, no. 5, pp. 3059-3069.

9. Лисютин В.А., Ластовенко О.Р. Оценка влияния внутреннего и вязкого трения на дисперсию и затухание звука в неконсолидированных морских осадках. *Акустический журнал*, 2020, т. 66, № 4, с. 420-436. DOI: 10.31857/S0320791920040061. [Lisyutin V.A., Lastovenko O.R. Assessing The Influence of Internal and Viscous Friction on Dispersion and Sound Attenuation in Unconsolidated Marine Sediments. *Acoustical Physics*, 2020, vol. 66, no. 4, pp. 401-415. DOI: 10.1134/S1063771020040065. (In Russ.)]

10. Лисютин В.А., Ластовенко О.Р., Ярошенко А.А. Комплексное применение лучевого и волнового подходов к расчетам звуковых полей в условиях узкого волновода на шельфе Черного моря. *Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря*, 2020, № 1, с. 91-102. [Lisyutin V.A., Lastovenko O.R., Yaroshenko A.A. Kompleksnoye primeneniye lucheвого i volnovogo podkhodov k raschetam zvukovykh poley v usloviyakh uzкого volnovoda na shel'fe Chernogo morya. *Ekologicheskaya bezopasnost' pribrezhnoy i shel'fovoy zon morya*, 2020, no. 1, pp. 91-102. (In Russ.)]

FREQUENCY-TIME ANALYSIS OF UNDERWATER SOUNDS OF MARINE MAMMALS. BALEEN WHALE

Lisyutin V.A., Lastovenko O.R. Degtyar A.D., Yaroshenko A.A., Petrenko N.V., Luchin V.L., Rybakova K.A., Papkov S.O.

Sevastopol state university

Universitetskaya Str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: vlisiutin@mail.ru

Abstract. The development of offshore areas of the sea leads to human intervention in the existing ecosystems and threatens the life of marine mammals. The study, analysis, and systematization of cetacean sounds can make it possible to identify the species and number of individuals. On the other hand, whales are the emitters of the lowest frequency sounds in the waveguide. If the location of the source and receiver is known, time-frequency analysis of the sound field can be used to invert the acoustic properties of the sea floor. The paper provides an overview of the species of marine mammals – baleen whales and radiated types of high-frequency and low-frequency sounds. The frequency-time analysis of sounds emitted by baleen whales is performed. The results are presented in the form of time implementations and spectrograms. It is shown that waveguide conditions of sound propagation introduce specific dispersion distortions. There can be a big difference between the sound emitted and recorded using a hydrophone. The paper shows the principal possibility of using low-frequency mammalian sounds to solve problems of inversion of acoustic properties of the sea floor.

Key words: *marine mammal sounds, phase velocity dispersion, dispersion distortions, normal modes, time-frequency analysis.*

LIGHT ACCLIMATION OF UNICELLULAR RED ALGA *RHODELLA VIOLACEA*: ΔpH BUILD UP, ANTENNA REASSEMBLING AND PHOTOPROTECTION

Neverov K.V.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences
Leninsky prospect 33, Moscow, 117071, Russia; e-mail: neverovk@mail.ru

Received: 18.07.2020

Abstract. Thylakoid membranes of red algae contain water-soluble membrane-bound complexes – phycobilisomes (PBSs) serving as peripheral antennae for photosystem II (PS II). Strong light absorbed by the PBSs triggers a fast formation of transthylakoid ΔpH that follows the non-photochemical quenching of chlorophyll (Chl) fluorescence. The ΔpH build-up seems to be essential for photoprotecting the photosynthetic apparatus in the absence of xanthophyll cycle common to higher plants. However, the mechanisms of this process are yet to be studied in detail. Here we report on study the Chl fluorescence quenching in unicellular red algae *Rhodella violacea* and its correlation with the ΔpH gradient being formed. The relation of this phenomenon to PS II photoprotection in the normal and high light-acclimated *Rhodella* cells is also examined. Under the photoinhibitory conditions (white light of 2000-3000 μE/m²s), the ΔpH -dependent Chl fluorescence quenching was found to delay the kinetics of PS II photoinhibition. The uncouplers like nigericin and NH₄Cl are known to break down ΔpH gradient and lead to the dissipation of Chl fluorescence quenching followed by enhancing the PS II photoinhibition rate. The same effect showed far-red (FR) light transthylakoid ΔpH consumption. ATPase inhibitor (DCCD) having no impact on ΔpH didn't influence PS 2 photoinhibition as well This implies the photoprotection to be fulfilled by the proton gradient rather than by ATP synthesis. Light acclimation of *Rhodella* cells to higher irradiances (500-1000 μE/m²s) results in a partial loss of the periphery phycoerythrin-containing subunits by PBSs. Here we show that the light-acclimated cultures display a higher resistance to the photoinhibitory light than the non-acclimated ones. This could be explained by diminishing the energy transfer from the reduced PBSs to PS II and light screening by the secondary carotenoids synthesized during light exposure. Low-temperature (77K) fluorescence data allowed to evaluate the molecular mechanisms contributing to suppressing Chl fluorescence in *Rhodella* cells and its recovery in darkness.

Key words: antenna reassembling, photoprotection, *Rhodella violacea*.

Abbreviations: LL, low light (40 μE/m²s); HL, high light (500 μE/m²s); XHL, extra-high light (1000 μE/m²s); Chl, chlorophyll "a"; PBS, phycobilisome(s), PE, B-phycoerythrin; PS 1&2, photosystem 1&2; PI, photoinhibition; ETC, electron transport chain

INTRODUCTION

All phototrophic organisms are capable of photosynthesis, i.e. absorption and transformation of solar energy resulting in synthesis of reduced compounds. Higher plants and algae produce molecular oxygen, a by-product of photosynthetic electron transport. The primary photosynthetic reactions are performed by pigment-protein complexes (CPs) embedded in thylakoid membranes [20].

The photosynthetic CPs comprise the reaction centers of photosystem 1 (PS 1), those of photosystem 2 (PS 2), and light-harvesting antenna complexes (LHC). Red algae and cyanobacteria differ from higher plants by lacking of large distant antenna complex LHC II. Instead of it, they have extramembrane antenna complexes, phycobilisomes (PBSs), attached mainly to PS 2 from the stromal part of thylakoids [13].

While photon flow is required for proper functioning of the photosynthetic electron transport chain (ETC), the excessive light intensity can inhibit photosynthesis and inflict irreversible damage to pigments and proteins of thylakoid membranes [1, 3].

Plants developed various photoprotective mechanisms to resist light stress [6, 11, 23, 24]. However, if these mechanisms of excessive energy relaxation are insufficient, the remaining flux of photons leads to the photosensitized formation of triplet chlorophyll and toxic singlet oxygen. The first target of photoinhibition is the PSII reaction center, which is associated with a loss of photochemical activity and variable fluorescence Fv [2, 7, 17, 19, 27, 28, 30].

One of the photoprotective mechanisms described for higher plants involves a down-regulation of PS 2 that proceeds simultaneously with the build-up of a proton gradient across the thylakoid membrane (ΔpH) [11]. It is often correlated with deepoxidation of xanthophylls located in LHC2 [6, 11, 14, 25, 29].

In *Rhodophyta* peripheral antennae – PBSs transfer excitation to core antennae of PS2, CP43 and CP47 protein-chlorophyll complexes where xanthophyll cycle is absent [13, 21]. However, a ΔpH-dependent Chl a fluorescence quenching can also be formed under strong light [8, 18]. Possible photoprotective role of ΔpH was studied for unicellular red alga *Rhodella violacea* [21, 22]. As a long-term response to light stress, photoacclimation takes place. This requires photoregulation of gene expression and several changes at the cellular level [22].

Studies on photoacclimation have compared the steady-state exposures to high light (HL) with the low light (LL) exposures. These investigations focused on various aspects of the differences between acclimated and LL-grown cells at the level of their ultrastructure, pigment content, light harvesting antenna size and PSII to PSI ratios [8, 26, 22].

The aim of the present research was to study different photoprotective mechanisms in red alga *Rhodella violacea*. In response to high light, the cells of *Rhodella* trigger a fast generation of transthylakoid ΔpH accompanying the non-photochemical quenching of Chl *a* fluorescence [8, 18]. We characterised this quenching, studied the effects of various irradiances and inhibitors. Under photoinhibitory conditions, the ΔpH -dependent Chl fluorescence quenching exerts a photoprotective role and delays the kinetics of photoinhibition [21, 22]. Here we provide additional evidence for photoprotective role of ΔpH -mediated non-photochemical Chl fluorescence quenching (NPQ) formation in LL-grown *Rhodella* cells and strong light acclimated ones as well.

Long-term acclimation of *Rhodella* to high light is accompanied by the reduction of antenna size (loss of the distal hexamers containing B-phycoerithrin (PE) [4]. We investigated the acclimation and its contribution to photostability of photosynthetic machinery of *Rhodella*.

MATERIALS AND METHODS

Rhodella violacea (strain 115-79 from Goettingen University, Germany) was grown photoautotrophically in sterile artificial seawater with the addition of vitamin B12 at 25 mg L⁻¹ [8, 9]. Cultures of 300 to 700 mL were incubated at 20°C in glass culture flasks continuously flushed with sterile air, and illuminated with fluorescent tubes with a 16-h light/8-h dark photoperiod [21, 22].

Cultures of 3-4 day-old were used for the experiments. Three different light intensities were used for the light acclimation: 40, 500, and 1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, defined as LL (low light), HL (high light), and XHL (extra high light) conditions. To standardize the culture conditions and minimize self-shading, cells were diluted every 3 days to 700 cells /ml with fresh medium. Full adaptation took 7 days; the cultures were diluted to 700 cells/ml 3 days prior to the photoinhibition experiments.

Rhodella suspensions were photoinhibited in a thermostated vessel (20°C) by white light at photon flux densities 2000-4000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Photoinhibited samples were stored in the dark at 20° C for 15 min prior to fluorescence induction measurements to provide full dissipation of NPQ [4, 21, 22].

Fluorescence induction kinetics of the PSII Chl at 20°C were measured in a laboratory-built continuous fluorimeter using green LEDs ($\lambda = 550 \pm 20$ nm, $I = 40 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) to provide continuous illumination of adjustable intensity and duration that served both as actinic and as detecting beam. The fluorescence was detected at 680 nm by a photomultiplier H 5700–50 (Hamamatsu Photonics, Japan). Data were collected in a computer with a 33- μs time resolution. The results were displayed on logarithmic time scale to present all phases of the kinetic curves together [21, 22].

At room temperature, fluorescence emanates mainly from the Chl *a* antenna of PSII [16]. Fluorescence yield is dependent on photochemical quenching and NPQ [26]. Photochemical quenching is dependent on the redox state of the primary acceptor of PSII, the plastoquinone Qa [16, 20]. When all PSII centers are open (Qa oxidized), they are efficient exciton traps and the fluorescence yield of PSII is low. When Qa is reduced, the centers are unable to trap excitons, the photochemical quenching is suppressed. Chl fluorescence can also be decreased by NPQ ascribed to two main processes occurring under strong light: ΔpH -dependent quenching and photoinhibition [8, 9, 18, 21-23, 26]. In the absence of photochemical quenching and NPQ, fluorescence reaches a maximum level F_m . The ΔpH -dependent quenching can be destroyed by nigericin (an uncoupler functioning as a proton-transporting ionophore) [9, 21, 22].

Low-temperature fluorescence of Chl and other photosynthetic pigments was detected in liquid nitrogen (77K) in Hitachi Spectrofluorimeter (Hitachi, Japan). Fluorescence band ratio PS 2/PS 1 was calculated to characterize any photodamage or changes of photosystems in the result of photoregulatory processes. Both excitation and emission spectra of 77 K fluorescence were used to estimate energy migration efficiency from PBSs to PS 2 and PS 1.

Absorption spectra of *Rhodella* suspension were registered at 20°C in double-beam Aminco spectrophotometer equipped with Shibata plate to diminish light scattering.

RESULTS

Photoprotective role of ΔpH -mediated non-photochemical Chl fluorescence quenching.

Similar to other photosynthetic organisms, dark-adapted *Rhodella* cells demonstrate typical OI-DPS fluorescence induction curves under continuous irradiation (green light, $I = 40 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) (Fig. 1). The initial value of F_0 corresponds to fluorescence of Chl in photosynthetic antennae when most of PS 2 reaction centers (RC) are open [18]. Once light photons are absorbed, primary and secondary quinone electron acceptors of PS 2 (Qa and Qb, correspondingly) are reduced and fluorescence reaches F_i maximum; this process takes about 20 microseconds. Since the double-reduced Qb migrate to plastoquinone pool (PQ) with slower rates compared to primary reactions, the F_i peak corresponds to the fully reduced Qb. Fluorescence reaches F_p maximum when all plastoquinones are reduced; usually 500-1000 ms is needed to that. Finally, the long-term monotonous decline of fluorescence is observed. This loss of fluorescence is considered to originate from non-photochemical quenching following the transthylakoid ΔpH build up. After the actinic light was turned on NPQ developed for 80-100 sec.

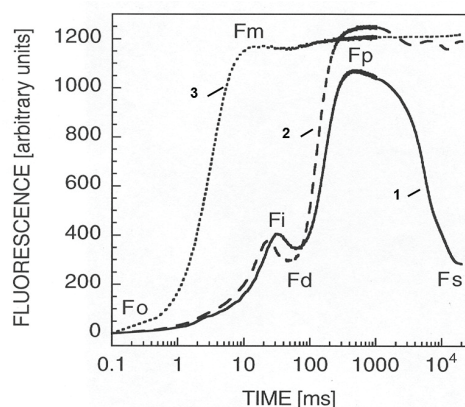


Figure 1. Fluorescence induction curves of LL-grown *Rhodella* cultures. Continuous fluorimeter with green LED excitation. Chl concentration - 5 $\mu\text{g/ml}$. (1) dark adapted cells grown at LL; (2) cells preincubated with 80 μM of nigericin; (3) cells preincubated with 10 μM of DCMU

Since PQ pool is always in an unstable equilibrium (strongly dependent on light intensity and spectrum) between Qb and Cyt b6f-complex consuming electrons from PQ to reduce PS 1, Fp amplitude is lower than the real maximal fluorescence [21, 26]. To obtain the maximal value Fm researchers usually add DCMU, which blocks the electron transport between Qa and Qb preventing ΔpH formation [18, 21]. When we loaded 10 μM DCMU to *Rhodella* cells prior to light irradiation we observed the fluorescence rise to Fm in 10 μsec (Fig. 1). To obtain solid evidence on the correlation between the ΔpH gradient and NPQ we added nigericin, a proton transporting ionophore disrupting transthylakoid ΔpH . The induction curve retains its shape reaching Fm level, but without Fs dip that reflects likely total dissipation of a non-photochemical quenching.

There are several findings pointing at ΔpH build up to be a fast photoprotective mechanism when light induced ΔpH -mediated protein conformational changes in antennae result in enhance of thermal dissipation of excess energy.

According to this suggestion, nigericin added to *Rhodella* suspensions in concentration of 80-100 μM enhanced photoinhibition rates, as it was measured by kinetics of Fv loss (variable Chl fluorescence, $F_v = F_m(F_p) - F_0$). Adding another uncoupler, NH_4Cl demonstrated the same effect although the effective concentrations were 10 times exceeding those for nigericin and, according to the fluorescence induction curve, a part of NPQ remains (data not shown).

In full agreement to the above statement, DCCD, inhibitor of chloroplast ATPase which has no effect on ΔpH gradient, didn't change kinetics of PS 2 photoinhibition [9].

One more evidence of a photoprotective role of transthylakoid ΔpH was found when far red irradiation was applied. Far red light (FR, $710 < \lambda < 760 \text{ nm}$) absorbed mainly by PS 1 brings about the dissipation of ΔpH and restoration of the Chl fluorescence (that is, dissipation of ΔpH -induced Chl fluorescence quenching). This effect was attributed to activating the chloroplast ATPase via a thioredoxine system [9, 21]. In the extra set of experiments we examined whether FR influences the photoinhibition rates.

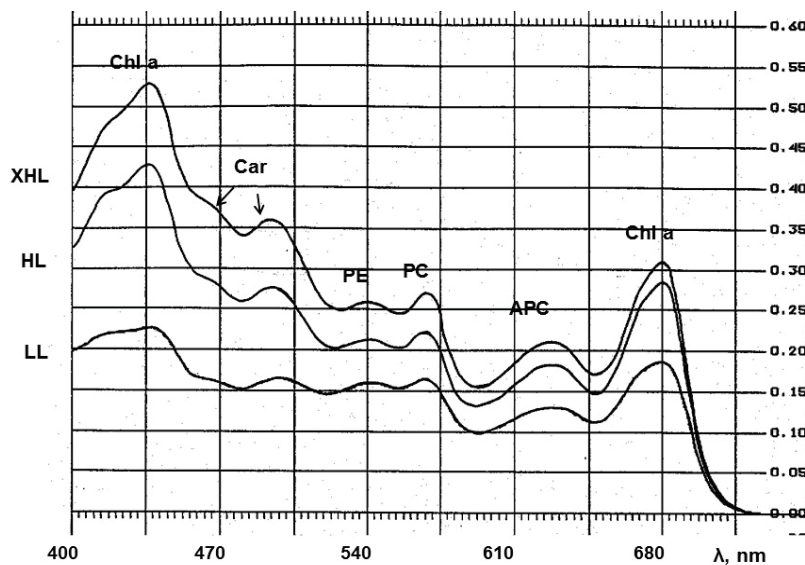


Figure 2. Absorption spectra of LL-grown and light-adapted *Rhodella* suspensions at 20°C. Chl concentration - 5 $\mu\text{g/ml}$. Optical pathway $l = 1 \text{ cm}$. LL - low light - 40 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$. HL - high light - 500 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$. XHL - extra high light - 1000 $\mu\text{E/m}^2\text{s}$. PE - B-phycoerithrin, PC - C-phycoerythrin, APC - allophycocyanin

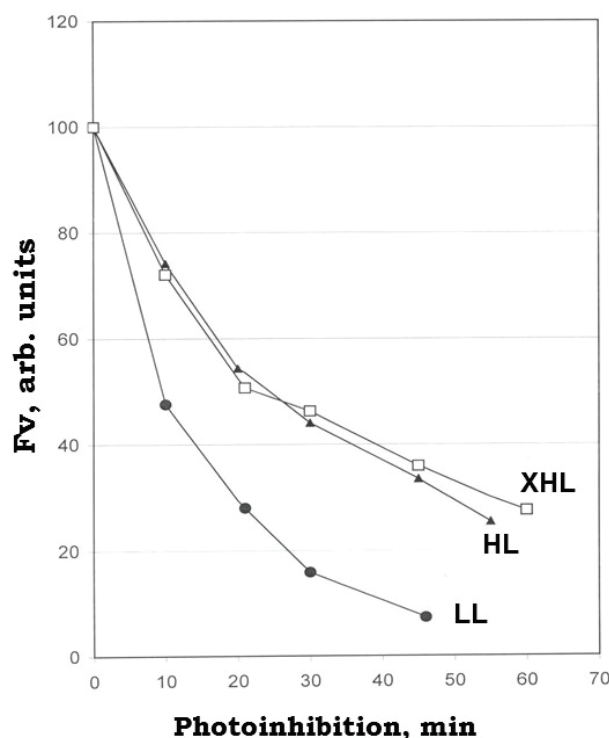


Figure 3. Kinetics of PS 2 photoinhibition in low light-grown and high light-acclimated *Rhodella* cells. Photoinhibition: white light (halogen lamp, $I = 4000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$). $[\text{Chl}] = 5 \mu\text{g}/\text{mL}$, $t^0 = 20^\circ\text{C}$. LL – $40 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. HL – $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. XHL – $1000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$

Simultaneous exposure of *Rhodella* suspensions to white light and FR slightly affected kinetics of photoinhibition obtained in the absence of FR. It is reasonable since FR source provided much less light intensity and was unable to dissipate ΔpH being formed under white light.

However, when we applied short (2 min) FR and white light exposures alternately, that is maintained an average lower level of ΔpH , we have observed a clear enhancement of photoinhibition rates even in LL grown *Rhodella* cells; the difference was about 25% after 20 min of light exposure (data not shown). These results confirm the importance of the fast transthylakoid ΔpH build up to resist the algal photosynthetic apparatus against strong light.

Acclimation to strong light of LL-adapted *Rhodella* cells.

The low light grown *Rhodella* cultures were acclimated to strong light from 3 to 7 days. LL-grown cultures were transferred to HL or XHL intensities. Such adaptation was previously shown to cause partial loss of PE-containing distal hexamers in PBS antenna and suppression of synthesis of the PE chromophore [22]. This phenomenon can be visualized as a progressive change in the colour of the cultures, which turn greenish.

As it follows from Figure 2, despite of equal Chl content ($5 \mu\text{g Chl}/\text{mL}$) in all three samples (LL, HL, XHL) their absorption spectra differ from each other. Changes in the blue part of absorption spectra of the *Rhodella* suspensions indicate the lower content of PE and increased carotenoid bands. The excessive amounts of carotenoids are known to be accumulated in response to light stress and the effect is common for numerous species of microalgae. These "secondary" carotenoids localize in lipid particles outside photosynthetic membranes so that they probably serve as a "screen" to protect chlorophyll proteins from the strong light [5, 25].

Because of a more friable thylakoid packing in the light-adapted cultures, the sieve effect was different among LL, HL and XHL samples resulting in the different OD value in the red Chl absorption peak. That is why we measured the total light absorption (1-T) by these suspensions and took these values for final correction of the photoinhibition curves.

Light adaptation and photoinhibition.

Since photoinhibition of PS 2 is a complex physiological process induced by oversaturation of electron transport via PS 2 ("acceptor-side photoinhibition") the influence of photodamage rates on the effective antenna size seems to be natural [3].

We have studied PS 2 photoinhibition in *Rhodella* cultures adapted for strong (HL and XHL) light. Results show that at $2000\text{--}4000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ photon fluxes the photoinhibition kinetics were: $\text{LL} > \text{HL} > \text{XHL}$ (Fig. 3). The difference between HL and XHL was clearly less than one between HL (XHL) to LL probably because of a complete detachment of PE hexamers even under HL light intensity ($500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$).

The obtained data demonstrate the kinetics of Fv loss to be delayed in HL and XHL-adapted cultures as compared to the LL-grown ones. This is consistent with the fact that PBSs in *Rhodella* are preferentially attached to PS 2 rather than to PS 1, so a smaller antenna size in high light-grown cells prevents PS 2 from excessive energy flow and decreases the photodamage.

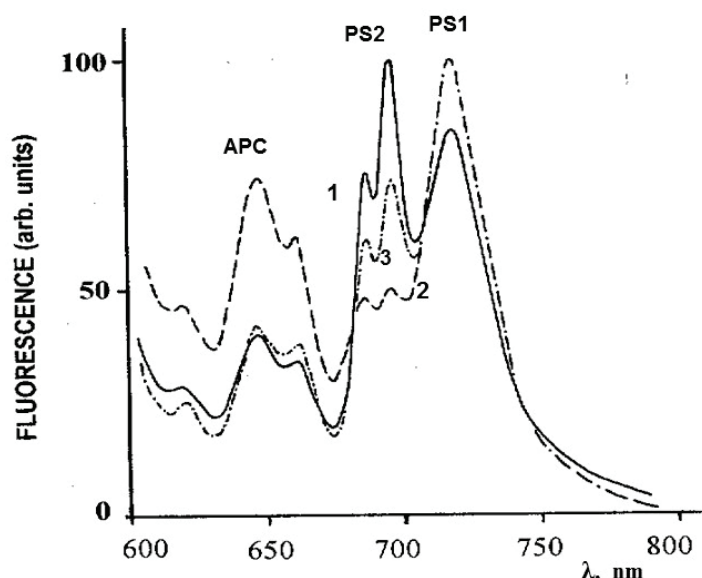


Figure 4. Low temperature (77K) fluorescence of pigments in the cells of *Rhodella violacea*. 1 – control cells (LL-grown). 2 – Photoinhibition: 25 min. 3 – Photoinhibition: 25 min + dark recovery 2 h

Interestingly, FR irradiation enhanced the photoinhibition rates in all three types of *Rhodella* cultures what confirms the above suggestion that ΔpH gradient accompanied by NPQ is the fastest and possibly the most universal photoprotective mechanism existing in red algae.

Low temperature fluorescence and “state transitions-like” mechanism.

Fluorescence spectra of thylakoid membranes at 77K provide valuable information on as PS 2 as PS 1 since Chl fluorescence at the liquid nitrogen temperature is emitted by both photosystems. Under the excitation at 560 nm (PE absorption maximum in phycobilisome) we detected in *Rhodella* cells fluorescence of PS 2 at 686 and 696 nm and of PS 1 at 720 nm. Additional characteristic maximum at about 645 nm was observed and prescribed to APC, the terminal energy acceptor in the core part of phycobilisomes. In contrast to PE protein complexes APC core proteins were stable during the light adaptation to high irradiances, so that this band was used as an amplitude marker.

We have shown that the photoinhibited *Rhodella* cells manifest a decrease of both PS 2 and PS 1 fluorescence bands referred to APC emission (Fig. 4), likely, because of the photodamage done to both photosystems with their integrity being impaired. Dark recovery of the photoinhibited cultures demonstrated a partial restoration of PS 2 and PS 1 bands and increase of PS 2 / PS 1 ratio. Faster restoring of PS 2 may be explained by a *de novo* synthesis and a subsequent turnover of D1 protein; the process is light inducible [28].

Since the 77K fluorescence was excited by green light absorbed mainly by PE we have calculated the ratio of Chl and PE maxima in fluorescence excitation spectra during high light adaptation of *Rhodella* cultures. We found that during 72 hours of adaptation of LL-grown cultures to HL ratio of emission bands F686/F648 (PS2 band to APC band) declined and F718/F648 (PS1 band to APC band) increased. The ratio of excitation maxima E572/E681 (PE band to Chl band, fluorescence detection at 735nm) increased supporting the ideas that part of PBSs detaches from PS 2 and move to PS 1 increasing energy migration to PS 1. This process resembles the “state transition”, a light adaptation mechanism described for higher plants although in this case it occurs within a longer time scale [8]. Alternatively, the described effect may be explained in terms of light-accelerated *de novo* PBS synthesis where the newly synthesized phycobilisomes associate preferentially with PS 1 [4]. Clearly, this phenomenon requires further investigations.

CONCLUSION

The fastest mechanism of photoprotection in red algae is the light-induced build up of transthylakoid ΔpH , which may be easily followed by the non-photochemical fluorescence quenching [8, 21]. The important role of ΔpH -gradient in photoprotection was confirmed by the photoinhibition acceleration under FR light known to reoxidize the plastoquinone pool and enhance the dark dissipation of ΔpH .

The obtained results reveal that the acclimation of *Rhodella violacea* to strong light (500 or 1000 $\mu E/m^2s$) leads to a better photostability of its photosynthetic machinery. The reasonable explanation may run as follows: when the antenna size is reduced (detachment of PE-containing distal proteins), the energy flow to PS 2 discharging exciton pressure to ETC also goes down.

This subsequently suppresses the photoinhibition rates in HL and XHL acclimated cells. It is worth mentioning that photoinhibition kinetic curves for HL and XHL samples were close to each other pointing at the possibility that both PE hexamers in PBS rods to detach under HL irradiance, hence, the increase of light intensity to XHL didn't additionally reduce the antenna size.

“Non-photosynthetic” secondary carotenoids, synthesized under high irradiance and accumulated outside the photosynthetic membranes can provide additional barrier against the photon excess.

According to the data on 77K fluorescence, the photoinhibitory light is destructive for both PS 2 and PS 1 though the photosystems are capable to recover partially in darkness. PS 2 recovers faster than PS 1 obviously because fast renewability of the key D1 protein.

Acclimating the *Rhodella* cells to high light for 72 h results in a decrease of energy transfer from PBS to PS 2 and simultaneous increase of PBS-to-PS 1 energy migration. These preliminary results obtained by analyzing both the emission and excitation fluorescence spectra point to the “state-transitions-like” process going on the light-acclimating *Rhodella* cells. Although the state transitions such as an adaptive mechanism had been described exclusively for higher plants, they could also exist in red algae). However, this issue has to be further elucidated.

Author is grateful to Prof. Anne-Lise Etienne (Laboratoire de Dynamique des Membranes Vegetales, ENS CNRS, Paris, France) for given opportunity to perform the experimental research and for helpful discussion. Proofreading of the manuscript was kindly performed by Anastasia Sharapkova (Rosetta Stone MSU Proofreading Service).

References:

1. Anderson J.M., Park Y.-I., Chow W.S. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiol. Plant.*, 1997, vol. 100, pp. 214-223.
2. Aro E.-M., Virgin I., Andersson B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. biophys. Acta*, 1993, vol. 1143, pp. 113-134.
3. Barber J., Andersson B. Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends biochem. Sci.*, 1992, vol. 17, pp. 61-66.
4. Bernard C., Etienne A.L., Thomas J.C. Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (Rhodophyta): compared effects of high light and translation inhibitors. *J. Phycol.*, 1996, vol. 32, pp. 265-271.
5. Chekanov K., Schastnaya E., Neverov K., Leu S., Boussiba S., Zarka A., Solovchenko A. Non-photochemical quenching in the cells of the carotenogenic chlorophyte *Haematococcus lacustris* under favorable condition and under stress. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, vol. 1863, pp. 1429-1442.
6. Choudhury N.K., Aslam M., Huffaker R.C. Photochemical activities in wheat chloroplasts incubated under irradiation and possible protection by zeaxanthin. *Photosynthetica*, 1994, vol. 30, pp. 397-405.
7. Critchley C., Russell A.W. Photoinhibition of photosynthesis in vivo: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plant.*, 1994, vol. 92, pp. 188-196.
8. Delphin E., Duval J.C., Etienne A.-L., Kirilovsky D. State transitions or pH dependent quenching of photosystem 2 fluorescence in red algae. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, pp. 9435-9445.
9. Delphin E., Duval J.C., Etienne A.-L., Kirilovsky D. pH-dependent photosystem 2 fluorescence quenching induced by saturating, multirunover pulses in red algae. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 118, pp. 103-113.
10. Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. biophys. Acta*, 1990, vol. 1020, pp. 1-24.
11. Demmig-Adams B., Adams W.W. III Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.*, 1992, vol. 43, pp. 599-626.
12. Eskling M., Arvidsson P.-O., Akerlund H.-E.: The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.*, vol. 100, pp. 806-816.
13. Gantt E. Phycobilisomes. *Annu Rev Plant Physiol.*, 1981, vol. 32, pp. 327-347.
14. Horton P., Ruban A.V., Young A.J. Regulation of the structure and function of the light-harvesting complexes of photosystem II by the xanthophyll cycle. In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (ed.): *The Photochemistry of Carotenoids. Kluwer Academic Publ., Dordrecht*, 1999, vol. 8, pp. 271-291.
15. Koller K.P., Wehrmeyer W., Schneider H. Isolation and characterization of disc-shaped phycobilisomes from the red alga *Rhodella violacea*. *Arch. Microbiol.*, 1977, vol. 112, pp. 61-67.
16. Krause G.H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.*, 1991, vol. 42, pp. 313-349.
17. Mishra N.P., Francke C., van Gorkom H.J., Ghanotakis D.F. Destructive role of singlet oxygen during aerobic illumination of the Photosystem II core complex. *Biochim. biophys. Acta*, 1994, vol. 1186, pp. 81-90.
18. Muller P., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, pp. 1558-1566.
19. Neverov K.V., Krasnovsky A.A. Jr., Zabelin A.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Ya. Low-temperature (77 K) phosphorescence of triplet chlorophyll in isolated reaction centers of Photosystem II. *Photosynthesis Research*, 2015, vol. 125, pp. 43-49.
20. Ort D.R., Yocum C.F. Electron transport and energy transduction in photosynthesis: an overview. In: Ort D.R., Yocum C.F. (ed.): *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 1996, pp. 1-9.
21. Ritz M., Neverov K.V. and Etienne A.-L. pH-dependent fluorescence quenching and its photoprotective role in the unicellular red alga. *Rhodella violacea. Photosynthetica*, 1999, vol. 37, no. 2, pp. 267-280.
22. Ritz M., Thomas J.-C., Spilar A., and Etienne A.-L. Kinetics of photoacclimation in response to a shift to high light of the red alga *Rhodella violacea* adapted to low irradiance. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 123, pp. 1415-1425.

23. Satoh K., Murata N., Asada K., Tsuyoshi E., Junichi M., Chikahiro M. Molecular mechanism for relaxation of and protection from light stress. in *Stress Responses of Photosynthetic Organisms*. eds Satoh K, Murata N (Elsevier Science Publishing, Amsterdam), 1998, pp. 37-52.
24. Siefermann-Harms D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.*, 1987, vol. 69, pp. 561-568.
25. Solovchenko A.E., Neverov K.V. Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. *Photosynthesis Research*, 2017, vol. 133 (1-3), pp. 31-47.
26. Strasser R.J., Srivastava A. Govindjee Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.*, 1995, vol. 61, pp. 32-42.
27. Strizh I.G., Neverov K.V. Photoinhibition of photosystem II in vitro: Spectral and kinetic analyses. *Russian Journal of Plant Physiol.*, 2007, vol. 54, pp. 439-449.
28. Virgin I., Salter A.H., Ghanotakis D.F., Andersson B. Light-induced D1 protein degradation is catalyzed by serine-type protease. *FEBS Lett.*, 1991, vol. 281, pp. 125-128.
29. Young A.J., Philip, D., Frank, H.A., Ruban, A.V., Horton, P. The xanthophyll cycle and carotenoid mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure appl. Chem.*, 1997, vol. 69, pp. 2125-2130.
30. Zabelin A.A., Neverov K.V., Krasnovsky A.A.Jr., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Shkuropatov A.Ya. Characterization of the low-temperature triplet state of chlorophyll in photosystem II core complexes: Application of phosphorescence measurements and Fourier transform infrared spectroscopy. *BBA – Bioenergetics*, 2016, vol. 1857, pp. 782-788.