

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 5, № 4
2020**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 5, № 4
2020**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 5, No. 4, 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, № 4, 2020

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Ю.Д. Нечипуренко, Д.А. Семёнов**
Неканонические пары GC и эпигенетика 567
- Б.Л. Оксенгендлер, Н.Н. Тураева, Н.Н. Никифорова, М.В. Минина, М.В. Чечулина, Ф. Искандарова**
Гипотеза об универсальной роли Оже-каскада в отборе элементного состава и хиральной диссиметрии макромолекул в живых системах 571
- Я.В. Мегер, А.О. Лантушенко, Е.А. Водясова**
Влияние степени фильтрации данных секвенирования на качество и полноту de novo сборки транскриптома 580
- И.В. Дегтяр, А.О. Лантушенко, А.С. Лелеков**
Сравнительный анализ различных протоколов выделения ДНК *Arthrospira platensis* 587
- Л.М. Апашева, А.В. Лобанов, Н.А. Лукина, К.Ф. Сергейчев**
Развитие *in vitro* растений огурца «Конкурент» на ранних этапах роста в условиях фотореспирационного стресса 592

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- Р. Мендоза-Баез, М.А. Моралес, А. Луна Флорес, Р. Агустин Серрано, А.М. Сервантес Тавера, А.А. Эрнандес Сантьяго**
Modeling reaction kinetics of ZnO microparticles synthesized via microwave: ab initio simulation 596
- Э. Соларес, М.А. Моралес, А. Луна-Флорес, А.М. Сервантес-Тавера, А.А. Эрнандес-Сантьяго**
Modeling and computational simulation of photocatalysis of a bismuth oxyaluminum for air remediation 604
- Дж.А. Эрнандес Агирре, Дж.А. Арзола Флорес, Е. Видаль Роблес, Ф. Савиньон Флорес, А. Мальдонадо Гарсия, Г. Гуарнерос Беджарано, Ф. Рохас Родригез, А.А. Эрнандес Сантьяго**
Multilayer perceptron neural network for the prediction of the ripening stages of fruits and vegetables 609
- Л.О. Костюкова, С.В. Леонтьева, Д.П. Воронин, К.А. Рыбакова, А.С. Бучельников, В.В. Костюков**
Теоретический анализ фотоиндуцированных электронных переходов акридинового желтого 614

Э.В. Терешкин, К.Б. Терешкина, Ю.Ф. Крупянский Миграция орцинола через модельные мембраны <i>Escherichia coli</i>	619
---	-----

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Ю.М. Гармаза Детергент-резистентные мембраны в эритроцитах человека: влияние ионов цинка на их модификацию	623
А.Х. Аширметов, Ф. Искандарова, Н.Н. Никифорова, Б.Л. Оксенгендлер Солитонная доставка возбуждений и стимулирование биохимических реакций медицинского назначения в живых системах	629
Н.А. Колтовая Моделирование мутантной формы инозин трифосфат пирофосфогидролазы человека R32T-ITPA и потенциальные регуляторные химические модификации фермента	637
Н.А. Колтовая, Н.И. Жучкина, Э.Б. Душанов Распределение мутаций в молекуле белка дрожжевой аргинин пермиазы CAN1	644
Г.А. Набережных, А.А. Сергеев, О.Ю. Портнягина, Д.К. Чистюлин, Е.В. Сидорин, О.Д. Новикова Биоконъюгирование коллоидных квантовых точек сульфидов кадмия и надмолекулярных структур белка-порина из бактерий рода <i>Yersinia</i> . Получение и характеристика	652
Д.А. Файзуллин, Ю.А. Валиуллина, В.В. Сальников Структура композитных гидрогелей на основе фибрина и галактана картофеля	659
В.В. Внуков, И.В. Кролевец, А.А. Плотников, А.А. Ананян, М.А. Колесников, Н.П. Милютин Роль системы оксида азота и провоспалительных цитокинов в механизмах патогенеза дегенеративных заболеваний суставов	665
А.В. Тамашевский, Ю.М. Гармаза, В.В. Пасюков, Е.И. Слободжанина Экспрессия транспортных и цитозольных белков при формировании множественной лекарственной устойчивости в клетках миеломы человека <i>in vitro</i>	672
С.В. Авакян, Л.А. Баранова Микроволновые излучения в онкологии: о возможности торможения злокачественного митоза	680
Е.М. Бакурова, В.С. Дорошкевич, Н.М. Добаева, Ю.Д. Турсунова О роли эритроцитов в перераспределении железа в тканях у больных раком распространенных стадий	689
Е.А. Генералов, Л.В. Генералова Влияние полисахаридов на течение COVID-19	693
О.Д. Смирнова, В.Е. Лукьяшин, Ю.П. Сёмочкина, С.Т. Латушкин, А.В. Родина, Е.Ю. Москалёва Использование пленочной дозиметрии и моделирования глубинного распределения поглощенной дозы при облучении клеток мыши низкими дозами протонов на циклотроне У-150	697

В.А. Головкин, А.В. Козловская

Калиевые каналы играют ключевую роль в формировании автоматии в синоаурикулярном узле мыши 704

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА**Л.Э. Алескерова, К.А. Аленина, А.И. Исмаилов**

Специфические спектральные и эмиссионные характеристики низкотемпературных штаммов морских фотобактерий 709

К.А. Аленина, Л.Э. Алескерова, А.Д. Исмаилов

Экологические особенности морских светящихся бактерий Арктического региона 713

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

Частотно-временной анализ подводных звуков морских млекопитающих. Зубатые киты 718

А.А. Мосунов, В.П. Евстигнеев, О.С. Сизова, М.И. Лернер

Исследование спектроскопическими методами судовых покрытий, обогащенных наночастицами оксидов металлов 725

А.А. Мосунов, В.П. Евстигнеев, О.С. Сизова, И.В. Головченко,**О.С. Завьялова, Е.С. Полупан, Ю.Р. Дульчук**

Исследование методами инфракрасной спектроскопии защитных покрытий кораблей с биметаллическими наночастицами 730

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2020 ГОД 734

CONTENTS

Volume 5, No. 4, 2020

GENERAL BIOPHYSICS

- Y.D. Nechipurenko, D.A. Semyonov**
Non canonical base pairs & epigenetics 567
- B.L. Oksengendler, N.N. Turaeva, N.N. Nikiforova, M.V. Minina, M.V. Chechulina, F. Iskandarova**
Hypothesis about the universal role of the auger cascade in the selection of the elemental composition and chiral dissymetry of macromolecules in living systems 571
- Y.V. Meger, A.O. Lantushenko, E.A. Vodiasova**
Influence of the degree of sequencing data filtering on the quality and completeness of the de novo transcriptome assembly 580
- I.V. Degtyar, A.O. Lantushenko, A.S. Lelekov**
Comparative analysis of different protocols for DNA extraction from *Arthrospira platensis* 587
- L.M. Apasheva, A.V. Lobanov, N.A. Lukina, K.F. Sergeichev**
Development of cucumber plant *in vitro* on early growth stages under conditions of photorespirator stress 592

MODELLING IN BIOPHYSICS

- R. Mendoza-Baez, M.A. Morales, A. Luna-Flores, R. Agustin-Serrano, A.M. Cervantes-Tavera, A.A. Hernandez-Santiago**
Modeling reaction kinetics of ZnO microparticles synthesized via microwave: ab initio simulation 569
- E. Solares, M.A. Morales, A. Luna-Flores, A.M. Cervantes-Tavera, A.A. Hernandez-Santiago**
Modeling and computational simulation of photocatalysis of a bismuth oxyalurer for air remediation 604
- J.A. Hernandez-Aguirre, J.A. Arzola-Flores, E. Vidal-Robles, M.F. Saviñon-Flores, A. Maldonado-García, G. Guarneros-Bejarano, J.F. Rojas-Rodríguez, A.A. Hernandez Santiago**
Multilayer perceptron neural network for the prediction of the ripening stages of fruits and vegetables 609
- L.O. Kostyukova, S.V. Leontyeva, D.P. Voronin, K.A. Rybakova, A.S. Buchelnikov, V.V. Kostyukov**
Theoretical analysis of photo-induced electronic transitions of acridine yellow 614

E.V. Tereshkin, K.B. Tereshkina, Y.F. Krupyanski Orcinol migration through model membranes of <i>Escherichia coli</i>	619
---	-----

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

Y.M. Harmaza Detergent-resistant membranes in human erythrocytes: influence of zinc ions on their modification	623
A.Kh. Ashirmetov, F. Iskandarova, N.N. Nikiforova, B.L. Oksengendler Soliton excitation delivery and stimulation of biochemical reactions for medical purposes in living systems	629
N.A. Koltovaya Modeling mutant human inosine triphosphate pyrophosphohydrolase P32T-ITPA and potential regulatory chemical modifications of the enzyme	637
N.A. Koltovaya, N.I. Zhuchkina, E.B. Dushanov Landscape of mutation substitutions in yeast arginine CAN1 permease	644
G.A. Naberezhnykh, A.A. Sergeev, O.Yu. Portnyagina, D.K. Chistyulin, E.V. Sidorin, O.D. Novikova Bio-conjugation of colloidal quantum dots of cadmium sulphides and supramolecular structures of protein-porin from bacteria of the genus <i>Yersinia</i> . Obtaining and characteristic	652
D.A. Faizullin, Yu.A. Valiullina, V.V. Salnikov Structure of composite hydrogels based on fibrin and potato galactan	659
V.V. Vnukov, I.V. Krolevets, A.A. Plotnikov, A.A. Ananyan, M.A. Kolesnikov, N.P. Milyutina Role of the nitrogen oxide system and pro-inflammatory cytokines in the pathogenetic mechanisms of degenerative joint diseases	665
A.V. Tamashevski, Y.M. Harmaza, V.V. Pasiukov, E.I. Slobozhanina Expression of transport and cytosolic proteins under the formation of multidrug resistance in human myeloma cells <i>in vitro</i>	672
S.V. Avakyan, L.A. Baranova Microwave radiations in oncology: about possibility of inhibition of malignant mitosis	680
E.M. Bakurova, V.S. Doroshkevich, N.M. Dobaeva, Yu.D. Tursunova The role of erythrocytes in the redistribution of iron in advanced tumors of gastric or colon cancer	689
E.A. Generalov, L.V. Generalova Influence of polysaccharides on COVID-19	693
O.D. Smirnova, V.E. Lukyashin, Yu.P. Semochkina, S.T. Latushkin, A.V. Rodina, E.Yu. Moskaleva Using of film dosimetry and simulation of the depth distribution of the absorbed dose at the irradiation of mouse cells with low doses of protons on the U-150 cyclotron	697
V.A. Golovko, A.V. Kozlovskaya The potassium channels play a pivotal role in formation of automaticity in the mouse sinoauricular node	704

ECOLOGICAL BIOPHYSICS**L.E. Aleskerova, K.A. Alenina, A.D. Ismailov**

Specific spectral and emission characteristics of low-temperature strains of marine photobacteria 709

K.A. Alenina, L.E. Aleskerova, A.D. Ismailov

Ecological features of marine luminous bacteria from the Arctic region 713

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. Toothed whales 718

A.A. Mosunov, V.P. Evstigneev, O.S. Sizova, M.I. Lerner

Study of shipboard coatings enriched with metal oxide nanoparticles by spectroscopic methods 725

A.A. Mosunov, V.P. Evstigneyev, O.S. Sizova, I.V. Golovchenko, E.C. Polupan, Yu. Dulchuk

Infrared spectroscopy of protective coverings of ships with bimetallic nanoparticles 730

INDEX OF ARTICLES PUBLISHED IN THE JOURNAL FOR 2020 734

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ПАРЫ GC И ЭПИГЕНЕТИКА

Нечипуренко Ю.Д.¹, Семёнов Д.А.²¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

г. Москва, РФ; e-mail: nech99@mail.ru

² Институт биофизики СО РАН

г. Красноярск, РФ

Поступила в редакцию: 20.07.2020

Аннотация. В течение последних десяти лет работы в области ЯМР ДНК позволили регистрировать не только канонические Уотсон-Криковские пары в ДНК, но и существующие несколько миллисекунд неканонические пары. Оказалось, что почти все возможные способы, которыми можно соединить нуклеотиды, реализуются при физиологических условиях в обычной ДНК. Мы проанализировали свойства неканонических пар оснований ГЦ и их связь с механохимическим расщеплением ДНК. Предложена гипотеза об участии переходных воббл пар оснований ГЦ (GC wobble) в механизмах механохимического расщепления ДНК и эпигенетических процессах с участием 5-метилцитозина. Гипотеза объясняет увеличение частоты разрывов сахарофосфатного остова ДНК после цитозинового, асимметричный характер этих разрывов и увеличение частоты разрывов CpG после метилирования цитозина. Эпигенетические свойства 5-гидроксиметилцитозина, 5-формилцитозина и N4-метилцитозина также находят своё объяснение в рамках нашей гипотезы. Появляется представление о том, что регуляторные белки узнают не метильную группу на цитозине, а гораздо более масштабное искажение структуры ДНК, вызванное GC wobble парой. GC wobble пара позволяет объяснить повышенную частоту дезаминирования цитозина, то есть высокую частоту мутаций в регуляторных участках.

Ключевые слова: эпигенетика, GC воббл пары ДНК, механохимическое расщепление ДНК, таутомерия цитозина, переходные неканонические пары оснований.

Два направления работ в современной молекулярной биофизике близко подошли к фундаментальным основам эпигенетики. ЯМР исследования переходных неканонических пар нуклеотидов в ДНК развиваются последние 10 лет, прежде всего в работах Ai-Hashimi и соавторов [1,2]. Изучение селективности механохимического расщепления ДНК началось с работы Гроховского 2006 года и связано с отечественными исследователями [3-10]. Мы обнаружили, что два этих направления стыкуются, но при этом требуют предположить, что GC пара в ДНК может переходить в воббл (wobble) форму. Наше предположение позволяет объяснить существующие результаты механохимического расщепления ДНК. Гипотеза позволяет предложить простые способы проверки и при этом предсказывает системные связи между таутомерией, эпигенетикой, мутагенезом и конформационной динамикой нуклеотидов ДНК.

Работы С.Л. Гроховского и соавторов продемонстрировали неслучайный характер фрагментации ДНК ультразвуком: частота разрывов сахарофосфатного остова зависела от последовательности нуклеотидов. Механохимическая фрагментация ДНК является этапом подготовки к процедуре секвенирования нового поколения (NGS), это позволило подтвердить результаты на больших объемах экспериментальных данных. Одновременно большие объемы данных вскрыли сильное влияние метилирования цитозина на частоту разрыва ДНК после цитозина в динуклеотиде CpG [7-10]. Возможность объяснить эпигенетические эффекты метилирования цитозина выводят работы по механохимическому расщеплению ДНК на передний край современной молекулярной биологии.

В течение последних десяти лет работы в области ЯМР ДНК позволили регистрировать не только канонические Уотсон-Криковские пары в ДНК, но и существующие несколько миллисекунд неканонические пары [1,2]. Оказалось, что почти все возможные способы, которыми можно соединить нуклеотиды, реализуются при физиологических условиях в обычной ДНК. Удивительным результатом этого направления оказалась экспериментальная демонстрация высокой частоты встречаемости таких неканонических пар. Например, пара АТ при комнатной температуре в одном проценте случаев образует не Уотсон-Криковскую, а Хугстиновскую структуру. Такая распространенность позволяет высказать предположение о биологической значимости этих структур. Например, Хугстиновские пары рассматривались как связанные с эпигенетическими свойствами 5-метилцитозина в теоретической работе [11], но в дальнейшем эксперимент не подтвердил данную гипотезу [2]. Необходимо отметить, что сам метод, развиваемый Ai-Hashimi и соавторами, привлекает значительный интерес, так как открывает возможность использования ЯМР для изучения динамики ДНК и РНК. В основе этого метода лежит вычислительная модель подвижности нуклеотидов в ДНК, но эта модель требует долгой калибровки с привлечением данных множества экспериментов. В результате получается метод дорогостоящий, хотя потенциально мощный. Оправданием затрат может быть изучение биологически очень важных характеристик, например, эпигенетических свойств 5-метилцитозина.

Гипотеза о роли GC wobble пар в эпигенетике и расщеплении ДНК ультразвуком. Разрывы ДНК ультразвуком чаще всего происходят после цитозина и в значительной степени зависят от ближайшего

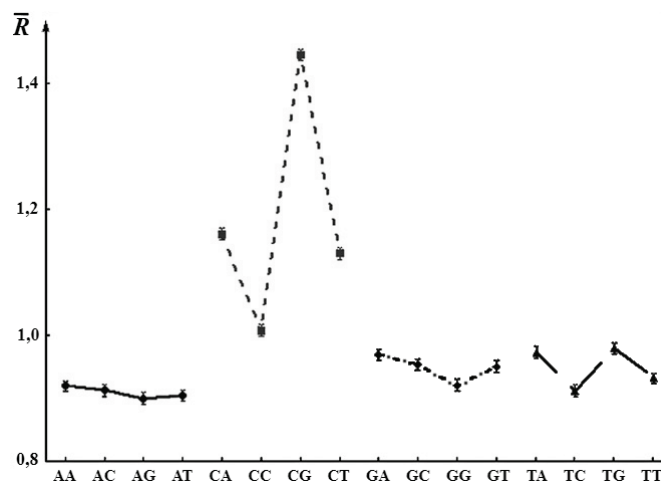


Рисунок 1. Средние значения относительных интенсивностей ультразвукового расщепления для динуклеотидов (данные из работы [6])

нуклеотидного окружения. В этом ряду выделяется динуклеотид CpG, для которого частота разрыва сахарофосфатного остова в цепи ДНК после цитозина (в направлении 5' – 3') в примерно в полтора раза выше, чем для других динуклеотидов, не содержащих в первом положении цитозина (рис. 1).

Причину повышения частоты разрыва можно искать в свойствах цитозина. Цитозин может участвовать в образовании неканонических пар оснований в различных структурах на основе ДНК. Например, кроме известных «параллельной ДНК» [12,13] и G-квадруплекса обнаружена ещё одна структура – I форма ДНК, которая образована четырьмя цитозинами [14]. Для цитозина характерна повышенная способность образовывать таутомерную (имино) форму. Таутомерная форма цитозина потенциально способна формировать GC wobble пары (рис. 2). Кроме склонности цитозина к таутомеризации, необходимо также указать на возможность протонирования азота N3 в слабокислой среде. Следует отметить, что протонированная форма цитозина также потенциально способна к формированию подобной пары (рис. 2, справа). Гроховский в пионерной работе по расщеплению ДНК ультразвуком [3] обратил внимание, что понижение pH до 5 значительно увеличивает фрагментацию, что как раз соответствует протонированию цитозина. Таким образом, предлагаемая пара объясняет один из экспериментально наблюдаемых феноменов.

GC wobble пары и эпигенетика. Для того, чтобы понять, как на формирование GC wobble пар влияет метилирование цитозина, необходимо принять во внимание, что метилирование способствует переходу цитозина в форму имино таутомера. Подобное влияние заместителя можно пронаблюдать еще у трех производных цитозина, демонстрирующих эпигенетические свойства: 5-гидроксиметилцитозина, 5-формилцитозина и N4-метилцитозина (рис. 3). Таким образом, мы получаем возможность привести все эпигенетические модификации цитозина к общему объяснению: модификации сдвигают таутомерное равновесие и управляют созданием неканонических GC wobble пар.

Некоторые следствия предлагаемой гипотезы. Возможно, метилирование цитозина в ДНК в составе динуклеотидов CpG облегчает появление переходных GC wobble пар. Такие пары могли бы узнаваться регуляторными белками. GU и GT пары могут появляться в ДНК под действием мутации дезаминирования цитозина и 5-метилцитозина, соответственно. Ферменты репарации узнают эти пары, то есть они взаимодействуют с локальным нарушением спирали ДНК. Вероятно, схожий механизм использует цитозин(C5)-ДНК-метилтрансфераза при поиске места метилирования ДНК для обнаружения переходных GC wobble пар.

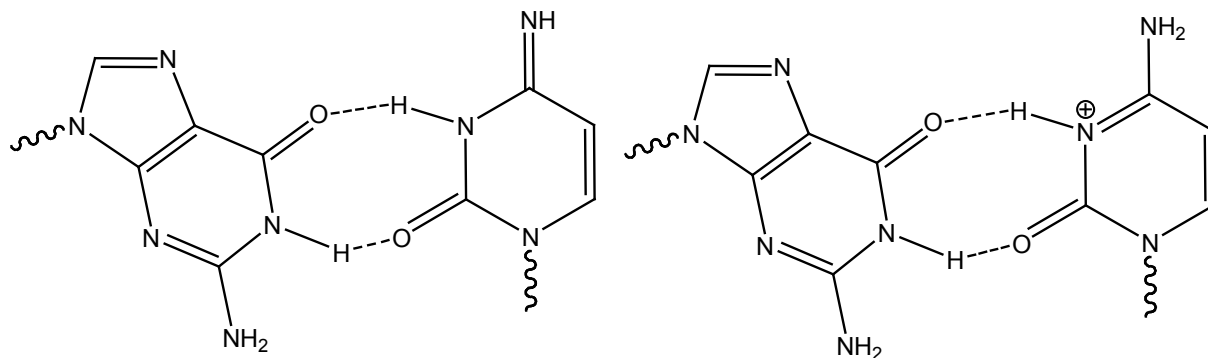


Рисунок 2. Переходная GC wobble пара (слева) и GC+ wobble пара (справа)

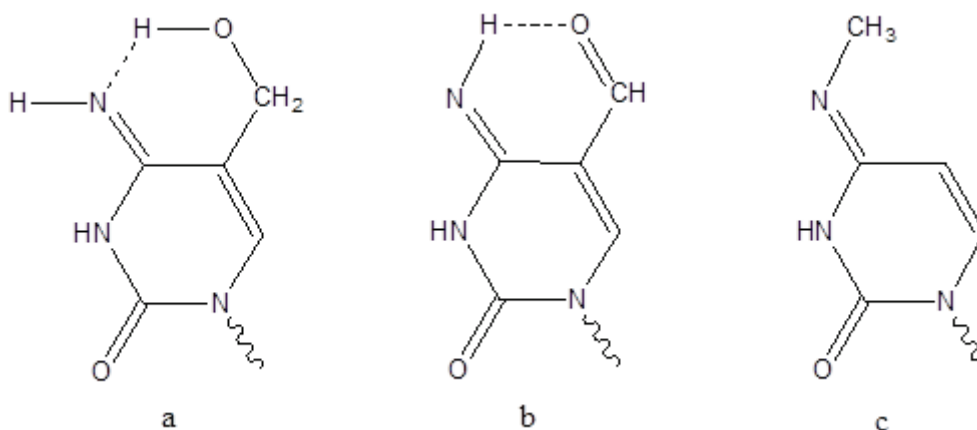


Рисунок 3. Эпигенетические производные цитозина в форме имино таутомеров: 5-гидроксиметилцитозин (а), 5-формилцитозин (b) и N4-метилцитозин (с)

Регуляторные белки, узнающие метилированные цитозины в CpG в составе ДНК, могут использовать схожий механизм узнавания. Сравнение структур этих трех классов белков: ферментов репарации, метилтрансфераз и регуляторных белков, узнающих 5mCpG, может дать материал для дополнительного анализа предлагаемого эпигенетического механизма [15,16]. Заметим также, что в работах [15,16] приведены данные ЯМР цитозина, которые свидетельствуют в пользу нашей гипотезы.

Современные представления о ДНК отличаются от «статичной» конструкции Уотсона и Крика. ДНК «дышит» и «волнуется», её пары «качаются» и переходят в разные состояния. Управление неканоническими парами в ДНК - это управление не только структурой, но и динамикой, так как эти пары короткоживущие и запасенная при их создании энергия через короткое время будет преобразована в колебания ДНК. Эпигенетика всё больше становится объектом биофизики.

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить Д.М. Грайфера за плодотворные дискуссии.

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

Список литературы / References:

1. Nikolova E.N., Goh G.B., Brooks C.L., Al-Hashimi H.M. Characterizing the Protonation State of Cytosine in Transient G•C Hoogsteen Base Pairs in Duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, vol. 135, no. 6766-6769. DOI: 10.1021/ja400994e.
2. Rangadurai A., Kremser J2., Shi H., Kreutz C., Al-Hashimi H.M. Direct evidence for (G)O6...H2-N4(C)+ hydrogen bonding in transient G(syn)-C+ and G(syn)-m5C+ Hoogsteen base pairs in duplex DNA from cytosine amino nitrogen off-resonance R1ρ relaxation dispersion measurements. *J Magn Reson.*, 2019, vol. 308, p. 106589.
3. Гроховский С.Л. Специфичность расщепления ДНК ультразвуком. *Молекуляр. Биология*, 2006, т. 40, с. 317. [Grokhovskii S.L. The specific cleavage of DNA with ultrasound. *Molekuliarnaia biologiya*, 2006, vol. 40, pp. 317-325. (In Russ.)]
4. Гроховский С.Л., Ильичева И.А., Нечипуренко Д.Ю., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Нечипуренко Ю.Д. Локальные неоднородности структуры и динамики двухспиральной ДНК: исследование при помощи ультразвука. *Биофизика*, 2008, т. 53, с. 417-425. [Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Panchenko L.A., Polozov R.V., Nechipurenko Y.D. Ultrasonic cleavage of DNA: quantitative analysis of sequence specificity. *Biophysics*, 2008, vol. 53, p. 250.
5. Нечипуренко Ю.Д., Головкин М.В., Нечипуренко Д.Ю., Ильичева И.А., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Гроховский С.Л. Характерные особенности расщепления ДНК ультразвуком. *Журнал структурной химии*, 2009, т. 50, с. 1040-1047. [Nechipurenko Yu.D., Golovkin M.V., Nechipurenko D.Yu., Il'icheva I.A., Panchenko L.A., Polozov R.V., Grokhovskii S.L. Characteristics of ultrasonic cleavage of DNA. *Journal of Structural Chemistry*, 2010, vol. 50, pp. 1007-1013. (In Russ.)]
6. Grokhovsky S.L., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Yu., Golovkin M.V., Panchenko L.A., Polozov R.V., Nechipurenko Yu.D. Sequence-Specific Ultrasonic Cleavage of DNA *Biophysical Journal*, 2011, vol. 100, pp. 117-125.
7. Poptsova M.S., Il'icheva I.A., Nechipurenko D.Y., Panchenko L.A., Khodikov M.V., Oparina N.Y., Polozov R.V., Nechipurenko Y.D., Grokhovsky S.L. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing. *Sci Rep.*, 2014, vol. 4, p. 4532.
8. Нечипуренко Ю.Д., Ильичева И.А., Абдуллаев Э.Т., Урошлев Л.А. и Гроховский С.Л. Физические характеристики регуляторных участков генома, эпигенетика и канцерогенез. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, с. 884-887. [Nechipurenko Y.D., Il'icheva I.A., Abdullaev E.T., Uroshlev L.A., Grokhovsky S.L. Physico-chemical properties of DNA in regulatory sites of genomes, epigenetics and cancerogenesis *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2018, vol. 3, pp. 884-887. (In Russ.)]

9. Ильичева И.А., Ходыков М.В., Панченко Л.А., Полозов Р.В., Нечипуренко Ю.Д. Ультразвуковое расщепление ДНК: анализ структурно-динамических характеристик регуляторных участков генома и ошибок секвенирования. *Биофизика*, 2020, т. 65, с. 504-511. [Il'icheva I.A., Khodikov M. V., Panchenko L.A., Polozov R.V., Nechipurenko Yu.D. Ultrasonic DNA Cleavage: Analysis of Conformational-Dynamic Features of Regulatory Regions in the Genome and Sequencing Errors *Biophysics*, 2020, vol. 65, pp. 504-511. (In Russ.)]
10. Uroshlev L.A., Abdullaev E.T., Umarova I.R., Il'icheva I.A., Panchenko L.A., Polozov R.V., Kondrashov F.A., Nechipurenko Y.D., Grokhovsky S.L. A Method for Identification of the Methylation Level of CpG Islands from NGS Data. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, p. 8635.
11. Semenov D.A. *Epigenetic effects of cytosine derivatives are caused by their tautomers in Hoogsteen base pairs*. arXiv:1410.6763
12. Чуриков Н.А., Чернов Б.К., Голова Ю.Б., Нечипуренко Ю.Д. Параллельные ДНК – возможность существования. *Доклады Академии Наук СССР*, 1988, т. 303, с. 1254-1258. [Tchurikov N.A., Chernov B.K., Golova Y.B., Nechipurenko Y.D. Parallel DNA-possibility of existence. In *Proc. Acad. Sci. USSR*, 1988, vol. 303, pp. 1254-1258. (In Russ.)]
13. Tchurikov N.A., Chernov B.K., Golova Yu.B., Nechipurenko Yu.D. Parallel DNA: generation of a duplex between two Drosophila sequences in vitro. *FEBS Lett.*, 1989, vol. 257, pp. 415-418.
14. Zeraati M., Langley D.B., Schofield P., Moye A.L., Rouet R., Hughes W.E., Christ D. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nature chemistry*, 2018, vol. 10, pp. 631-637.
15. Semyonov D.A., Nechipurenko Y.D. *Non-Canonical GC Base Pairs and Mechanochemical Cleavage of DNA*. arXiv:2001.03561
16. Semyonov D.A., Eltsov I.V., Nechipurenko Y.D. A new bias site for epigenetic modifications: How Non-Canonical GC Base Pairs favour Mechanochemical Cleavage of DNA. *BioEssay*, 2020. DOI: 10.1002/bies.202000051.

NON CANONICAL BASE PAIRS & EPIGENETICS

Nechipurenko Y.D.¹, Semyonov D.A.²

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

² Institute of Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Science
Krasnoyarsk, Russia

Abstract. Over the past ten years, work in the field of DNA NMR has made it possible to record not only canonical Watson-Crick pairs in DNA, but also non-canonical pairs that exist several milliseconds. It turned out that almost all possible ways to connect nucleotides are realized under physiological conditions in ordinary DNA. Properties of non-canonical GC Base Pairs and their relation with mechanochemical cleavage of DNA are analyzed here. A hypothesis of the involvement of the Transient GC Wobble Base Pairs in the mechanisms of the mechanochemical cleavage of DNA and epigenetic mechanisms with participation of 5-methylcytosine is proposed. The hypothesis explains the increase in the frequency of the breaks of the sugar-phosphate backbone of DNA after cytosine, asymmetric character of these breaks, and an increase in the frequency of breaks in CpG after cytosine methylation. The epigenetic properties of 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, and N4-methylcytosine are also explained within our hypothesis. There is an idea that regulatory proteins do not recognize the methyl group on the cytosine, but a much larger distortion of the DNA structure caused by the GC Wobble pair. GC Wobble pair allows to explain the increased frequency of cytosine deamination, that is, the high frequency of mutations in regulatory sites.

Key words: mechanochemical cleavage of DNA, transient Base Pairs in DNA, Wobble Base Pair, tautomer, 5-methylcytosine, molecular basis of epigenetics

ГИПОТЕЗА ОБ УНИВЕРСАЛЬНОЙ РОЛИ ОЖЕ-КАСКАДА В ОТБОРЕ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА И ХИРАЛЬНОЙ ДИССИМЕТРИИ МАКРОМОЛЕКУЛ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Оксенгендлер Б.Л.^{1,2}, Тураева Н.Н.³, Никифорова Н.Н.¹, Минина М.В.⁴, Чечулина М.В.⁴, Искандарова Ф.⁵

¹ Институт ионно-плазменных и лазерных технологий АН РУз

ул. Дўрмон йўли 33, г. Ташкент, 100125, Узбекистан; e-mail: oksengendlerbl@yandex.ru

² Институт химии и физики полимеров АН РУз

ул. А. Кадыри, 7 "б", г. Ташкент, 100128, Узбекистан

³ Webster University, Biological Department

470 East Lockwood Ave., St. Louis, MO 63119-3141, USA

⁴ ООО «NIKA PHARM», Отдел Качества

пр. 7-й Сайрам, 48 А, г. Ташкент, 100170, Узбекистан

⁵ Центр профилактики чумы, карантинных и особо опасных инфекций, Ферганский филиал,

ул. Янги Фаргона, 59, г. Янги Маргилон, 150113, Узбекистан

Поступила в редакцию: 27.07.2020

Аннотация. В статье формулируется гипотеза о возможности унифицированного решения двух фундаментальных проблем биологии на основе участия в процессах эволюции Оже эффекта в качестве фильтра; это - а) неоднородность элементного состава живых систем по атомному весу (существование «лидеров» и «аутсайдеров») и б) уникальная устойчивость гомохиральных биополимеров по отношению к флуктуациям локусов противоположной симметрии. Нами показано, что оба парадоксальных явления могут быть объяснены на основе одного и того же радиационного процесса – Оже-каскада после образования вакансии в К-оболочке с последующим «кулоновским взрывом» в биополимере, чему однако препятствует электронная нейтрализация – «заливание» из остальной неповрежденной цепи биополимера. Выяснено, что большая повреждаемость связана с наличием дополнительных электронных оболочек, а также с существованием хиральной деформации биополимера. Эти два обстоятельства позволяют разрешать парадоксы как качественно, так и количественно. В частности, предложенная гипотеза объясняет существование углеродной жизни и невозможность кремниевой жизни. Кроме того, усиление деструкции от Оже-каскада по мере увеличения хирального угла выявило особые точки повреждения хирального биополимера – области контактов двух доменов с различной хиральностью, которые «вымываются» ионизирующей радиацией с повышенной вероятностью, препятствуя образованию гетерохиральных полимеров. Отмечено, что процессы, лежащие в основе этих двух парадоксов, видимо, являются хорошими примерами общей концепции «complexity». Указано, что Оже-каскад – лишь один из типов процессов подпороговой радиационной физики, которые способны объяснить целый ряд низкотемпературных явлений в биологии.

Ключевые слова: биополимеры, парадоксы в биологии, элементный состав, хиральность, радиация, Оже-каскад, «кулоновский взрыв», электронная нейтрализация, «заливание».

1. Введение.

Среди учёных известно, что о зрелости той или иной области наук можно судить по наличию в ней сформулированных парадоксов, решение которых, почти всегда означает формулирование соответствующей парадигмы. Примеров этому было множество в разных эпохах, и в наше время стоит особо упомянуть тяжелейший спор между Больцманом и Пуанкаре (закончившейся трагической гибелью Больцмана) о якобы абсолютном противостоянии порядка и хаоса [1]. Как известно, серия работ Я.Г. Синая [2] выявило истинное положение дел: теорией биллиардов Синая удалось показать, что хаос и порядок регулируется величиной одно и того же параметра системы. Размышлениям о роли парадоксов на соответствующих стадиях развития разнообразных наук были посвящены усилия многих великих умов (Зенон, Н. Бор, Дж. Максвелл, А. Эйнштейн, Д. Бом, В. Мандельброт, Р. Том, И. Пригожин, П. Бак, П. Эренфест, Л. Мандельштам, и др.). На особую роль формулировки и решения парадоксов в структуре научных революций указали Т. Кун [3], Дж. Холтон [4], Е. Вигнер. Нетрудно заметить, что этот большой (и не полный!) список, большей частью связан с науками о неживой природе, в частности физики. Однако современное положение вещей несколько иное: можно с большой долей уверенности сказать, что особая роль парадоксов переместилась на биологические науки, т.е. на знания о живой природе. Это соображение ярко выявляется в интереснейших обзорах целого ряда больших учёных: В. Гольданского [5], В. Твердислова [6] и, на наш взгляд, особенно Г.Р. Иваницкого [7], где изложен путь и современное состояние трёхпозиционной парадигмы живых систем – фактически, для иллюстрации основных положений современной биологии был избран особый «язык парадоксов»! Итак, число таких парадоксов в биологии просто удивляет и, поэтому, особый интерес представляет поиск решения этих парадоксов на основе унифицированной причины. Исторический анализ показывает, что иногда это удавалось. Другой законный вопрос следующий: почему именно биология характеризуется таким обилием парадоксов. Это связано с

несколькими обстоятельствами: во-первых, живые системы неизмеримо сложнее неживых; во-вторых, бурное проникновение физики и математики в исследования живых систем и дало возможность открыть новые закономерности, представляющиеся парадоксальными в свете имеющихся парадигм. Каковы же пути намеченные для разрешения этих парадоксов в биологии? По мнению большого числа крупнейших авторитетов, склонных к крупным обобщениям, здесь путь состоит в формулировке принципиально нового подхода, который получил название «сложность» (complexity), а также единым образом может дать трактовку явлениям как в неживой, так и в живой природе. Этот подход – «complexity» уже в настоящее время имеет свою «азбуку», «динамику», «математику» [8-10], хотя и несколько различные для физики, химии и биологии, но этом пути уже имеются серьёзные успехи. В настоящее время концепцию «complexity» принято связывать с реализацией следующих свойств сложных систем и условий их функционирования: «нано», «фрактальность», «системы с низкой размерностью», «хиральность» и «синергетика». На этой основе парадигма в физике конденсированного состояния фактически уже сформирована, тогда как для биологии ситуация довольно заметно отстает. Среди различных парадоксов в области биологии в настоящей статье будет сделана попытка исследовать только два парадокса: 1). парадокс различия элементного состава в живой и неживой природе (существование в живой природе «лидеров» и «аутсайдеров» – в отличие от неживой и 2) парадокс необычайной устойчивости состояния максимальной хиральной диссиметрии в длинных биополимерных цепях (несмотря на обилие факторов этому препятствующих). Мы полагаем, что оба этих парадокса могут быть поняты на основе именно некоторых элементов «complexity», а также всегда присутствующего при эволюции радиационного воздействия.

2. Парадоксы: объекты, предметы и подходы к исследованию.

При обсуждении любой глубокой проблемы, как известно [11], необходимо сочлениить результаты трёх элементов: объекты исследования, предметы исследования, а также используемые методы исследования. Обсудим эту триаду для двух выбранных нами парадоксов.

2.1. Парадокс элементного состава живой природы, заключающийся в резком различии присутствия в живых системах, в качестве «лидеров» элементов первого и второго периодов таблицы Менделеева, тогда как «аутсайдерами» являются элементы третьего и более далёких периодов. При этом, необходимо отметить, что подобного разделения («лидеры» и «аутсайдеры») в неживой природе не наблюдается. Особой остроты эта проблема звучит следующим парадоксом: почему углеродная жизнь есть, а кремниевой нет? Имеется в виду, что все главные биополимеры построены на «костяке» из углерода, а не кремния, хотя энергетические параметры (потенциал ионизации и сродство к электрону) их весьма близки. Таким образом, объектом исследования являются длинные цепи на основе углерода и кремния. Предметами исследования является обнаружение причины такого парадоксального несоответствия (особенно, если учесть, что количество кремния на Земле в сотни раз больше чем углерода). Что же является фильтром, отбирающим в живую природу элементы 1-го и 2-го периода? В качестве метода исследования мы выберем такие методы, которые нам позволяют различить причины такого парадоксального поведения и здесь базовой идеей, будет служить простое соображение, что этот фактор фильтрации сопровождал изучаемые системы в течении всего времени эволюции. Что же было «всегда»? Напрашивается два ответа: это «Вода» и это «Радиация». Таким образом, необходимо выбрать в качестве метода исследования такой, который различит роль воды и радиации путём выявления их наиболее специфического и действенного отклика на указанные два фактора воздействия.

Роль водяного фильтра была обнаружена и выделена как особая Г.Р. Иваницким [12], который обратил внимание на то, что гидролиз длинных цепей углерода и кремния происходит принципиально различно: цепочки углерода оказались устойчивыми, тогда как цепочки на основе кремния – не устойчивыми. Иваницкий полагает, что такая различная химия связана с различием ионных радиусов углерода и кремния: мономеры из кремния, естественно длиннее, чем мономера из углерода. При этом всё же остаётся вопрос: действительно, для линейных цепей это, видимо, неоспоримый факт квантовой химии, но что сказать о цепях, которые обладают сложной деформированной формой, при которой происходит перекрывание отнюдь не только $\sigma - \sigma$ типа у соседних атомов. Ответ совершенно не очевиден и требует, несомненно, специального квантово-химического исследования. Более того, подобное разделение на «лидеров» и «аутсайдеров», по-видимому, наблюдается отнюдь не только у углерода и кремния, но и у других элементов для которых гидролиз не столь значим [13]. Что же является фильтром-сепаратором для них? По-видимому, есть смысл продумать этот вопрос более детально. Действительно, рассмотрим более широко комплекс причин, столь сильно различающих элементы второго и третьего периодов, для которых вода отнюдь не столь «страшный агент», а тем не менее фильтрующая сепарация имеется.

Перейдём ко «второму герою» упомянутому выше – радиации: именно в ней должен быть некий процесс, который разделяет радиационный отклик элементов второго и третьего периодов. Поиск такого элемента привёл нас к «простой» мысли, что элементы второго и третьего периодов имеют разное число электронных оболочек: например, у углерода их две (K и L), тогда как у кремния их три (K, L, M). Был ли и есть ли какой-либо радиационный процесс, столь существенно влияющий на участь элементов? Оказывается, был и есть: это эффект Оже, который состоит в ионизации (радиацией, например, рентгеновским излучением) самой глубокой оболочки этих элементов, то есть K-оболочки [14]. Атомная структура с «дыркой» в K-оболочке, естественно, не устойчива, и такая система релаксирует двумя возможными путями: при падении из L-оболочки в K-оболочку электрона энергия электронного перехода может «унестись» фотоном (флюоресценция); однако, возможен и другой канал – эта энергия передаётся соседнему электрону L-оболочки, в результате чего он «улетает» из

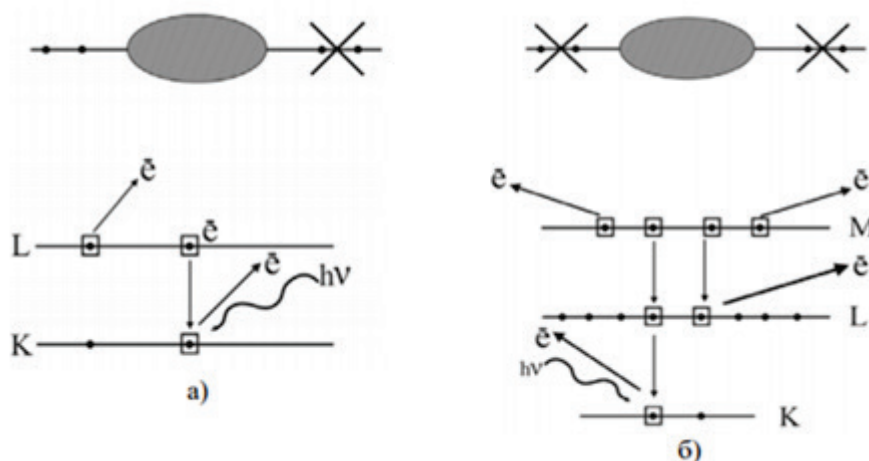


Рисунок 1. Разрушение биополимерных молекулярных цепей в результате «кулоновского взрыва», обусловленного Оже-каскадом, вызванным внешним радиационным воздействием на К-оболочку: а) случай углеродной цепи (при малом числе электронных подоболочек); б) случай кремниевой цепи (при большом числе электронных подоболочек)

области атома. Сравнение результатов этих двух путей указывает на их разительное отличие: в первом случае дырка «перескакивает» в L-оболочку, тогда как во втором случае в L-оболочке уже оказывается 2 дырки. Дальнейшая судьба этих двух дырок совершенно различна для атома углерода и атома кремния.

Сравнивая результаты Оже-процессов для цепочки углерода и цепочки кремния (рис. 1), видим, что в случае углерода первичная К-ионизация приводит к одностороннему разрыву цепи, тогда как в случае кремниевой цепочки происходит двухсторонний разрыв химической связи вокруг атома кремния. Такая конфигурация у углеродной цепи просто должна деформироваться, тогда как у кремниевого атома с разорванными связями обеих сторон цепи, должна происходить настоящая поломка макромолекулы. Но, в действительности, ситуация несколько более усложнена, поскольку, каждый Оже-переход происходит чрезвычайно быстро (обычно за время 10^{-15} сек). В квантовой механике показано [15], что такие быстрые процессы реализуются когда невозмущённые плотности электронов не успевают перестроиться за изменениями заряда, это так называемый, «эффект встряски», много лет назад просчитанный для ионизации атомов при бета-распаде А.Б. Мигдалом [16]. Оказалось, что эффект встряски приводит к дополнительной ионизации атома или молекулярной структуры там, где происходит быстрое изменение заряда, то есть, в рассмотренном нами случае углеродной цепи, в валентную зону влетают две дырки, а в валентную зону кремниевой цепочки влетают четыре дырки (рис. 1). Эти цифры Z_0 – для углерода = 2 и Z_0 – для кремния = 4; но это *средние величины зарядности*, а на самом деле от каждой К-ионизации имеется целый зарядный спектр (рис. 1). Таким образом, с учётом эффекта встряски вероятность появления в валентной зоне заряда, достаточного для деструкции полимерной цепи, определится выражением:

$$P_A = \int_{Z^*}^{\infty} F(Z_0, Z) dZ \quad (1)$$

Здесь Z^* минимальная величина заряда в результате выхода которого при Оже-каскаде в молекулярной системе происходит разрушительный «кулоновский взрыв» (в частности, для углеродной и кремневой цепей $Z^* = 4$).

Однако, как показано в серии работ [17,18] процессу разлета заряженных осколков молекулы противодействует интересный канал конкуренции – электронные «заливания» положительной зарядовой неоднородности окружающими электронами (в частности – электронами из целых частей молекулярной цепи). Очевидно, что условие завершения кулоновского взрыва, т.е. деструкции макромолекулы, предельно просто, т.е. разлет должен совершиться за время τ_+ , который меньше среднего времени заливания (нейтрализации) τ_e , т.е. $\tau_+ < \tau_e$. Однако, ситуация оказалась гораздо богаче – она вылилась в «парадокс Декстера-Варли» [19], решение которой было найдено много позднее [20] и связана с квантовой природой «электронного заливания». В результате конкуренции кулоновского разлета и электронного заливания деструкция происходит с вероятностью пропорциональной $\exp(-\tau_+/\tau_e)$. Поскольку τ_+ унифицировано ($\tau_+ \approx 5 \cdot 10^{-14}$ с), а «процесс заливания» очень чувствителен к особенностям разрушаемой среды (цепи), то τ_e изменяется в широком диапазоне (от 10^{-16} с – для металлов, до 10^{-11} для диэлектриков) и здесь процесс деструкции происходит с сечением (вероятностью) следующего вида [20]:

$$\sigma_d = \sigma_k \cdot P_A \exp(-\tau_+/\tau_e) \quad (2)$$

В этом выражении σ_k сечение ионизации К-электрона, а остальные понятия определены выше.

Величина сечения, как показывают многолетние исследования в радиационной физике полупроводников [20], в основном определяется величиной τ_e , оценка которой требует всегда особого анализа, но вместе с тем для

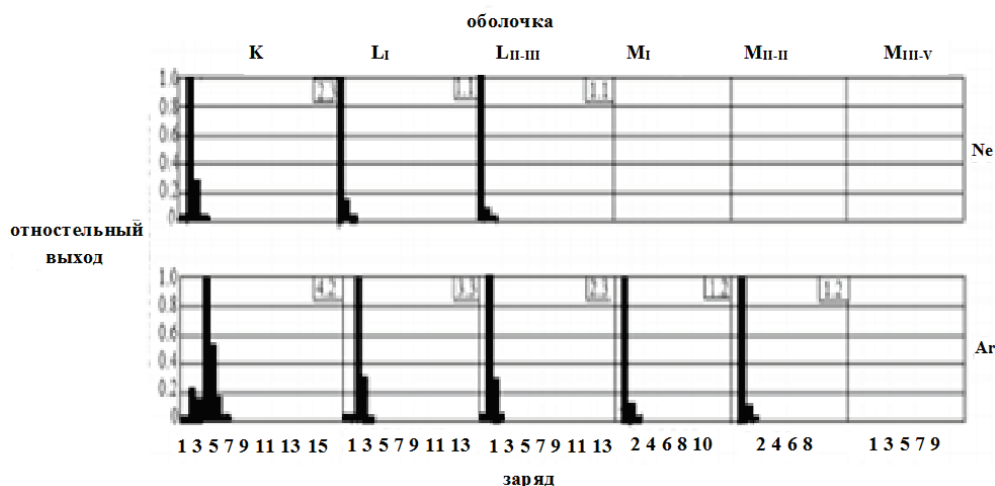


Рисунок 2. Спектры многозарядных ионов инертных газов при образовании вакансий в K-, L-, и M-оболочках (в углу указаны средние заряды, отклонение от которых вызвано эффектом встряски) [14]

него были получены и весьма общие результаты (для полупроводников, металлов, стекол); полимерные системы были исследованы на много хуже (и грубее), но этих результатов, как будет показано ниже, кажется достаточным для серьезных выводов, причем именно для нашей сформулированной проблемы (см. далее). Акцентируя свое внимание на величине τ_e , можно поискать свойства молекулярных цепей и особенно биополимерных, которые связаны с τ_e с помощью фундаментальных законов. Таким фундаментальным законом может быть связь ширины валентной зоны с τ_e путем соотношения неопределенностей Н.Бора: $\tau_e = \hbar/\Delta E_V$. Для различных полимеров величина $\hbar/\Delta E_V$ различна, так что понимая под τ_e время оседлой жизни «дырки» в валентной зоне видно, что уникальность полимера напрямую определяет τ_e , а значит и σ_d . Именно таким образом мы можем заключить, что различные биополимеры проявляются в вероятности деструкции в основном через P_A и τ_e . В этом плане оценки показывают, что σ_d для кремния существенно больше σ_d для углеродной цепи, так что именно кремниевые цепи более подвержены деструкции, нежели углеродные. Видимо, этот вывод, связанный с особенностями Оже-каскада в элементах второго и третьего периодов таблицы Менделеева, позволяет говорить о возможности проявления в парадоксе элементного состава живой природы лишней подоболочки элементов третьего периода по сравнению со вторым. Очень существенно, что для данного типа радиационного фильтра на основе Оже-переходов легко объясняется и разделение на лидеров и аутсайдеров не только для атомов углерода и кремния, но и для остальных элементов этого периода. Интересен однако вопрос и о том как для одного и того же типа биополимера проявляется его конфирмация в процессах деструкции. Именно на этом пути, как нам кажется, может быть обсужден и второй парадокс.

2.2. Парадокс аномальной устойчивости гомохиральных структур биополимеров.

Свойства хиральности многих молекул, открытых Л. Пастером [21] и Вант-Гоффом [22], с особой значимостью вышли на авансцену науки в связи с эволюцией биополимеров [23]. За долгие годы исследования различных проблем хиральности основных биополимеров было выяснено, что именно явление гомохиральности определяет чуть ли не всю биохимию живых систем (как в здоровье, так и в патологии; как в молодом, так и в старом организмах.) [24]. Вполне справедливо, что хиральная диссиметрия вошла «вторым номером» в триадную парадигму живых систем [7]. Вместе с тем, целый ряд вопросов до сих пор остается в поле дискуссии [25]. Одним из таких дискуссионных вопросов является удивительное свойство гомохиральных полимеров оставаться при своём росте не подвергающимися флуктуациям структуры, не смотря на обилие стимулирующих для этого факторов. В этой связи, возникает вопрос – в чём же причина такой парадоксальной устойчивости гомохиральности, почему по ходу длины биополимеров фактически не осуществляются отдельные локусы противоположного типа симметрии? Действительно, в физике конденсированного состояния, а точнее, в физике твёрдого тела, довольно часто имеет место такой дефект на дислокациях, перегиб или двойной перегиб. Большое количество теоретических и экспериментальных исследований именно этого частного свойства – двойникование малой области кристалла осуществляется флуктуационно, причём для этого не требуется большой энергии [26]. Переноса этот опыт на биополимеры определённого типа хиральности, совершенно не видно явных причин, почему в случае биополимеров это явление не реализуется. Что подавляет эти флуктуации – флуктуации вкрапления противоположной зеркальной симметрии структуры? Опять же, мы вынуждены говорить о выборе: «вода» или «радиация» (ведь они были, во все времена эволюции!)? Попробуем, используя идею аналогий, объяснить сформулированный в этом разделе парадокс удивительной устойчивости с помощью радиационного действия, причём, даже ограничиваясь Оже-эффектом.

В качестве предварительного объекта рассуждений используем представления о «Блоховской стенке», разделяющей два домена (рис. 3). Предположим, что в каждой из трёх областей объекта, изображённого на рисунке 3, с помощью радиационного воздействия в тяжёлом многоэлектронном атоме образуется глубокая (K-)

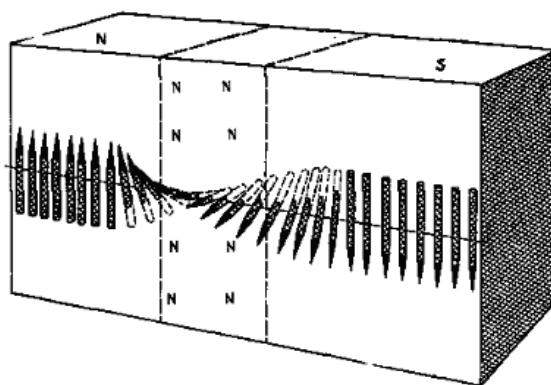


Рисунок 3. «Блоховская стенка» между областями макромолекулы с различной хиральностью

ионизация, то есть «дырка». Как этот однократный положительный заряд будет выноситься в валентную зону и способствовать деструкции полимера в каждой из трёх областей?

Очевидно, что общее выражение для вероятности (сечение) деструкции будет такое же, как и для примера предыдущего раздела, (2.1.) и мы можем записать для парциальных сечений деструкций в каждой области выражение типа формул:

$$\sigma_d = \sigma_k \cdot P_A \exp(-\tau_+/\tau_e^i) \quad (3)$$

Здесь знак i нумерует ситуации во всех трех частях «Блоховской стенки»: $i = 1$ и $i = 3$ это области отсутствия хиральной диссиметрии, тогда как область 2 и соответствует спиральности элементов макромолекулы. Согласно сказанному выше в разделе (2.1), сечение деструкции в областях 1 и 3 определяется формулой (3), тогда как сечение в области 2 будет несколько иным, и это вызвано различием величин τ_e^2 и $\tau_e^1 = \tau_e^3$. Для выяснения этого вопроса рассмотрим более детально элемент цепи мономера, являющийся частью длинного биополимера (рис. 4).

Здесь видно, что при двух типах деформации макро цепи (изгиб и кручение) наблюдается изменение перекрывания электронных орбиталей на концах мономера, что немедленно приводит к изменению их интеграла перекрывания: $S \neq S'$. Соответственно, этому неравенству интегралов перекрывания, не равны и обменные интегралы [24]:

$$\beta'/\beta = [S'/(1 + S')][S/(1 + S)] \approx S'/S \quad (4)$$

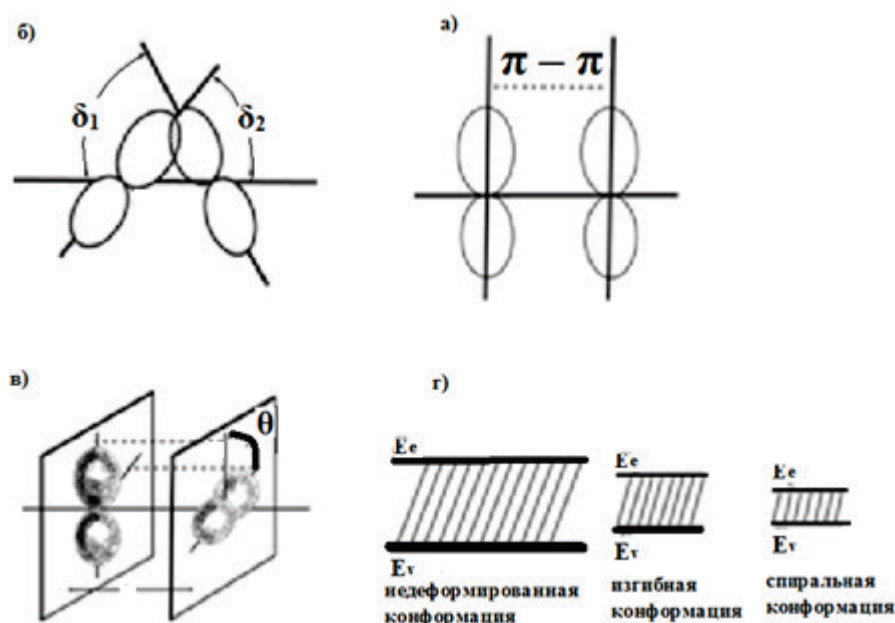


Рисунок 4. Схема типов мономеров: а) недеформированная конформация; б) изгибная деформация; в) хиральная деформация; г) схематическая деформация разрешенной зоны

Последняя формула позволяет, с учётом пропорциональности обменного интеграла ширине разрешённой электронной зоны, а также с учётом соотношения неопределённости Нильса Бора, немедленно получить зависимость отношения времён заливания деформированного и недеформированного биополимера через интегралы перекрытия.

$$\tau'_e/\tau_e = |\hbar/\Delta E_V|/|\hbar/\Delta E_V| \approx S/S' \quad (5)$$

После этого можно использовать найденные методами квантовой химии соотношения между интегралами перекрытия для деформированного и недеформированного участка через все углы деформации:

$$S' = S_{\sigma-\sigma}(\cos\delta)^2 + S_{\pi-\pi}(\sin\delta)^2 \cdot \cos\theta \quad (6)$$

Собирая все вышеприведённые формулы легко получим величину, доказывающую во сколько раз увеличивается дефектообразование в деформированных биополимерах:

$$\gamma(\delta, \theta) = [\sigma'_d/\sigma_d] \approx \{\exp[-\tau_+/\tau_e]\}^{(S'/S)-1} \quad (7)$$

Равенство (7) имеет очень важные частные случаи:

1. $\delta = 0$; $\theta \neq 0$, что даёт $d\sigma_d/d\theta > 0$ (хиральная конформация)
2. $\delta \neq 0$; $\theta = 0$, что даёт $d\sigma_d/d\theta \geq 0$ (изгибная конформация; знак этой величины зависит от исходного типа связи ($\sigma - \sigma$ или $\pi - \pi$))

Отметим, что выше обозначенный случай (1) и есть тот важный результат, который нам понадобится далее, и он гласит, что с увеличением хирального угла θ вероятность деструкции хиральной цепи возрастает, причём, как показывает детальный анализ, он возрастает по закону

$$\gamma(\delta, \theta) = \gamma(\delta, 0)^{(S'/S)} \quad (8)$$

Перейдем теперь к исследованию основного предмета данного раздела – уникальной устойчивости гомохиральных цепей к появлению локуса противоположной симметрией. Рассмотрим гомохиральный полимер, и пусть в результате тепловой флуктуации на нем образуется локус иной – противоположной симметрии. Это означает что появляются либо одна, либо две границы доменов с противоположной симметрией. Теперь учтем, что во время эволюции с течением времени вся эта цепь, включая и границы доменов, подвергается облучению (например, рентгеновскому). Тогда в каждом из участков этой длинной цепи стохастически генерируются К-дырки на самых глубоких электронных оболочках тяжелых многоэлектронных атомов цепи, по уже обсужденной нами схеме, каждая из этих дырок в результате Оже-каскада вносит определенный заряд $Z > Z^*$, который оказывается в соответствующем месте валентной зоны. Дальнейшая судьба этой кулоновской нестабильности, как указывалось выше, сводится к кулоновскому взрыву (каждый в своей области локализации), либо к нейтрализации через электронное заливание. Далее, как следует из формулы (8), каждая потенциально способная к кулоновскому взрыву область действительно деструктурирует согласно своему сечению σ_d , причем σ_d будет зависеть от хирального угла θ в виде функции θ^2 , находящейся в показателе экспоненты. С увеличением θ резко уменьшается скорость заливания электронами и резко увеличивается сечение деструкции. Однако, в местах границы доменов угол изменения равняется 2θ , поэтому вероятность деструкции в этих местах увеличивается еще сильнее, пропорционально некоторому числу (которое больше единицы) в четвертой степени. Характерные оценки этого эффекта весьма впечатляющи: сечение Оже-деструкции для нехирального полимера в случае его хирального состояния может увеличиваться на два – три порядка, тогда как границы доменов при этом дают увеличение сечения деструкции в $10^4 - 10^8$. Это означает что как только к концу хирального биополимера присоединяется «кинородный мономер», то он с большой вероятностью «срезается» кулоновским взрывом от Оже-эффекта. Если же присоединяется «свой мономер», то возможная деструкция менее вероятна и на много порядков меньше, а для достройки следующего мономера имеется весьма большой период времени. Эти несложные соображения весьма легко приводят к кинетике нарастания длины биополимера, который с подавляющей вероятностью оказывается монохиральным.

3. Заключение.

В эволюции живых систем заметную роль играют множество факторов, и это обстоятельство является предметом весьма детального изучения [28]. Среди таких факторов всегда особого внимания требуют те факторы воздействия, которые сопровождали изучаемые системы всё время эволюции (в частности, «вода», «радиация»). В данной статье, как и в совокупности наших предыдущих работ, мы концентрировали внимание именно на *радиации*. Это связано со многими факторами. Кроме того, что она была «всегда», в частности, и с тем, что типы радиационного воздействия чрезвычайно разнообразны, а также разнообразны факторы воздействия каждого из них (энергия, интенсивность, доза, степень когерентности, поляризация). Из-за такого разнообразия почти всегда найдётся биологический (или предбиологический) объект, который под действием радиации существенно модифицирует многие свои свойства. Среди этих свойств, как совершенно особо важное свойство, следует упомянуть возможность стимулирования атомных перестроек (активационных процессов) при воздействии

радиации. Более того, среди эффектов подобного рода во второй половине 20-го века был выявлен совершенно особый класс атомных перестроек, так называемых электронно-стимулированных, которые легли в основу целой области радиационной физики – «подпороговой радиационной физики» [29]. К этой подпороговой радиационной физике относятся многие атомные процессы, для реализации которых отнюдь не нужна температура и они могут происходить и в «космическом холоде» [30]. Тип радиационного воздействия, способный на это достаточно широк, но, в первую очередь, это свет, ультрафиолетовое излучение, низкоэнергетическое рентгеновское излучение и т.д. Для этого типа атомных перестроек характерен такой сценарий: радиация возбуждает вначале электронную подсистему, а потом эти электронные возбуждения сбрасывают свою энергию на атомные степени свободы, в том числе на координату реакции. В качестве примера, именно применительно для биологии, можно упомянуть радиационно-стимулированные химические реакции, управляющие удлинением цепей с участием формальдегида (В.Гольданский и др.[30]). Однако в этих реакциях удлинения цепей, обязательно должна присутствовать и диффузионная стадия доставки «мономеров» к концам растущих цепей, то есть без радиационно-стимулированной диффузии здесь никак не обойтись. И такой механизм радиационно-стимулированной диффузии был предложен и получил название «инверсный механизм диффузии», который даже может превратить диффузانت в квазичастицу – дефектон; эта квазичастица получила название «инверсон» [31,32]; (недавние расчеты показали, что инверсный механизм диффузии способен весьма существенно снизить по времени начало биологического периода).

Изучаемый в настоящей статье механизм радиационной деструкции на основе Оже-процессов, целиком и полностью относится именно к подпороговой радиационной физике, возникшей на основе детальнейшего изучения повреждения кристаллов кремния низкоэнергичной радиацией – рентгеновским излучением и электронами [29]. Как показано в данной работе, выдвинутые соображения весьма основательно демонстрируют действенность механизма Оже-деструкции в двух парадоксальных биологических фактах: парадоксе элементного состава в живой природе и парадоксе уникальной устойчивости к флуктуациям гомотермальных состояний биополимеров. Не безынтересно отметить, что обсуждаемые особенности процессов деструкции в многоэлектронных атомах и входящих в хиральные биополимеры (типа РНК, ДНК) могут быть основой для подхода к борьбе с вирусами (в том числе и вызывающим COVID-19) на основе радиационно-стимулированной Оже-деструкции (серия наших публикаций принятых к печати [32,33]).

Список литературы / References:

1. Чернавский Д.С. *Синергетика и информация: Динамическая теория информации*. КД Либроком, 2016, 300 с. [Chernavsky D.C. *Synergetics and Information: Dynamic Information Theory*. KD Librokom, 2016, 300 p. (In Russ.)]
2. Синай Я.Г. Динамические системы с упругими отражениями. *УМН*, 1970, т. 2, с. 141-192. [Sinai Ya.G. *Dynamical Systems with Elastic Reflections*. *UMN*, 1970, vol. 2, pp. 141-192. (In Russ.)]
3. Кун Т. *Структура научных революций*. 1969, М.: Прогресс, 1977, 300 с. [Kuhn T. *The structure of scientific revolutions*. 1969, Moscow: Progress, 1977, 300 p. (In Russ.)]
4. Холтон Дж. *Тематический анализ науки*. М.: Прогресс, 1981, 384 с. [Holton J. *Thematic analysis of science*. M.: Progress, 1981, 384 p. (In Russ.)]
5. Гольданский В.И., Кузьмин В.В. Спонтанное нарушение зеркальной симметрии в природе и происхождение жизни. *УФН*, 1989, т. 157, с. 3-50. DOI: 10.3367/UFN.0157.198901a.0003. [Gol'dansky V.I., Kuzmin V.V. Spontaneous breaking of mirror symmetry in nature and the origin of life. *UFN*, 1989, vol. 157, pp. 3-50. (In Russ.)]
6. Твердислов В.А., Малышко Е.В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы. *УФН*, 2019, т. 189, № 4, с. 375-385. DOI: 10.3367/UFN.2018.08.038401. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V. Regularities of spontaneous formation of structural hierarchies in chiral systems of inanimate and living nature. *UFN*, 2019, vol. 189, no. 4, pp. 375-385. (In Russ.)]
7. Иваницкий Г.Р. XXI век: Что такое жизнь с точки зрения физики. *УФН*, 2010, т. 180, № 4, с. 337-369. DOI: 10.3367/UFN.0180.201004a.0337. [Ivanitsky G.R. XXI century: What is life from the point of view of physics. *UFN*, 2010, vol. 180, no. 4, pp. 337-369. (In Russ.)]
8. Sherrington D. Physics and Complexity. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 2010, vol. 368, pp. 1175-1189. DOI: 10.1098/rsta.2009.0208.
9. Milan Randi, Dejan Plav. On the Concept of Molecular Complexity. *CROATICA CHEMICA ACTA, CCACAA*, 2002, vol. 75, no. 1, pp. 107-116.
10. Mazzocchi F. Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity. *EMBO Reports*, 2008, vol. 9, no. 1, pp.10-4. DOI: 10.1038/sj.embor.7401147.
11. Мигдал А.Б. *Поиски истины*. М.: Молодая гвардия, 1983, 239 с. [Migdal A.B. *The search for truth*. Moscow: Molodaya gvardiya, 1983, 239 p. (In Russ.)]
12. Иваницкий Г.Р. Запоминание случайного выбора уничтожает альтернативы (ответ на комментарий к статье "XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики"). *УФН*, 2011, т. 181, № 4, с. 451-454. [Ivanitsky G.R. Memorizing a random choice destroys alternatives (response to the commentary to the article "XXI century: what is life from the point of view of physics). *UFN*, 2011, vol. 181, no. 4, pp. 451-454. (In Russ.)]
13. Кист А.А. *Феноменология биогеохимии и биоорганической химии*. Ташкент: Фан, 1987. [Kist A.A. *Phenomenology of biogeochemistry and bio-organic chemistry*. Tashkent: Fan, 1987. (In Russ.)]

14. Parilis E.S., Turaev N.Yu. et. al. *Atomic Collisions on Solid Surfaces*. Amsterdam-London-New York-Tokyo: North-Holland, 1993, vol. 93, no. 3, 382 p. DOI: 10.1016/0168-583X(94)95492-5.
15. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Теоретическая физика в 10 томах. Том 3. Квантовая механика (нерелятивистская теория)*. М.: Наука, 1989, 768 с. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Theoretical physics in 10 volumes. Volume 3. Quantum mechanics (nonrelativistic theory)*. Moscow: Nauka, 1989, 768 p. (In Russ.)]
16. Мигдал А.Б. *Качественные методы в квантовой теории*. М.: Наука, 1975, 336 с. [Migdal A.B. *Qualitative methods in quantum theory*. Moscow: Nauka, 1975, 336 p. (In Russ.)]
17. Varley J.A. Mechanism for the Displacement of Ions in an Ionic Lattice. *Nature*, 1954, vol. 174, pp. 886-887. DOI: 10.1038/174886a0.
18. Dexter D.L. Varley Mechanism for Defect Formation in Alkali Halides. *Physical Review*, 1960, vol. 118, p. 934.
19. Вавилов В.С., Кив А.Е., Ниязова О.Р. *Механизмы образования и миграции дефектов в полупроводниках*. М.: Наука, 1981, 368 с. [Vavilov V.S., Kiv A.E., Niyazova O.R. *Mechanisms of the formation and migration of defects in semiconductors*: Nauka, 1981, 368 p. (In Russ.)]
20. Оксенгендлер Б.Л., Тураева Н.Н. *Радиационная физика конденсированных сред. Концепции*. Ташкент: Фан, 2006, т. 1, 136 с. [Oksengendler B.L., Turaeva N.N. *Radiation physics of condensed media. Concepts*. Tashkent: Fan, 2006, vol. 1, 136 p. (In Russ.)]
21. Пастер Л. *Избранные труды в двух томах*. М.: АН СССР, 1960, 836 с. [Pasteur L. *Selected Works in Two Volumes*. Moscow: AN SSSR, 1960, 836 p. (In Russ.)]
22. Вант-Гофф Я.Г. *Избранные труды по химии*. М.: Наука, 1984, 544 с. [Van't Hoff Ya.G. *Selected works in chemistry*. Moscow: Nauka, 1984, 544 p. (In Russ.)]
23. Аветисов В.А., Гольданский В.И. Физические аспекты нарушения зеркальной симметрии биоорганического мира. *УФН*, 1996, т. 166, № 8, с. 873-891. [Avetisov V.A., Gol'dansky V.I. Physical aspects of breaking the mirror symmetry of the bioorganic world. *UFN*, 1996, vol. 166, no. 8, pp. 873-891. (In Russ.)]
24. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Жаворонков А.А. Хиральность как проблема биохимической физики. *Рос.хим.ж.*, 2007, т. 51, № 1, с. 13-22. [Tverdislov V.A., Yakovenko L.V., Zhavoronkov A.A. Chirality as a problem in biochemical physics. *Ros.khim. zh.*, 2007, vol. 51, no. 1, pp. 13-22. (In Russ.)]
25. Твердислов В.А., Малышко Е.В. Хиральный дуализм как системный фактор иерархического структурообразования в молекулярно биологической эволюции. *Сложность. Разум. Постнеклассика*, 2016, № 1, с. 78-83. DOI: 10.12737/18816. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V. Chiral dualism as a systemic factor of hierarchical structure formation in molecular biological evolution. *Complexity. Mind. Postneklassika*, 2016, no. 1, pp. 78-83. (In Russ.)]
26. Косевич А.М. *Физическая механика реальных кристаллов*. Киев: Наукова Думка, 1981, 328 с. [Kosevich A.M. *Physical mechanics of real crystals*. Kiev: Naukova Dumka, 1981, 328 p. (In Russ.)]
27. Roberts J. *Notes on Molecular Orbital Calculations*. London . Amsterdam Don Mills, Ontario. Sydney. Tokyo: the benjamin cummings publshing company, INC., 1962, 156 p.
28. Волькенштейн М.В. *Общая биофизика*. М.: Наука, 1978, 592 с. [Volkenstein M.V. *General biophysics*. М.: Nauka, 1978, 592 p. (In Russ.)]
29. Юнусов М.С., Оксенгендлер Б.Л. и др. *Подпороговые радиационные эффекты в полупроводниках*. Ташкент: Фан, 1987, 222 с. [Yunusov M.S., Oksengendler B.L. et al. *Subthreshold radiation effects in semiconductors*. Tashkent: Fan, 1987, 222 p. (In Russ.)]
30. Гольданский В.И., Трахтенберг Л.И., Флеров В.Н. *Туннельные явления в химической физике*. Москва: Наука, 1986, 296 с. [Gol'dansky V.I., Trakhtenberg L.I., Flerov V.N. *Tunneling phenomena in chemical physics*. Moscow: Nauka, 1986, 296 p.]
31. Оксенгендлер Б.Л. The inverson--a new type of defecton. *JETP Letters*, 1976, vol. 24, no. 1, pp. 9-11.
32. Oksengendler B.L., Turaeva N.N. Periodic Landau-Zener problem in long-range migration. *Journal of Experimental and Theoretical Physics*, 2006, vol. 103, no. 3, pp. 411-414.
33. Оксенгендлер Б.Л., Тураева Н.Н., Зацепин А.Ф. и др. Селективное радиационное воздействие на нанополимеры и его применение к деградации актуальных вирусов. *Международная конференция «Радиационная физика твердого тела»*, Севастополь, 2020. (в печати) [Oksengendler B.L., Turaeva N.N., Zatsepin A.F. et al. Selective radiation action on nanopolymers and its application to the degradation of actual viruses. *International conference "Radiation Physics of Solids"*, Sevastopol, 2020. (in press) (In Russ.)]
34. Оксенгендлер Б.Л., Тураева Н.Н., Сулейманов С.Х. и др. Радиационная деструкция квазиодномерных молекулярных объектов: особенности и применение. *ДАН АН РВз*, 2020. (в печати) [Oksengendler B.L., Turaeva N.N., Suleimanov S.Kh. et al. Radiation destruction of quasi-one-dimensional molecular objects: features and applications. *DAN AN RUz*, 2020. (in press) (In Russ.)]

HYPOTHESIS ABOUT THE UNIVERSAL ROLE OF THE AUGER CASCADE IN THE SELECTION OF THE ELEMENTAL COMPOSITION AND CHIRAL DISSYMETRY OF MACROMOLECULES IN LIVING SYSTEMS

Oksengendler B.L.^{1,2}, Turaeva N.N.³, Nikiforova N.N.¹, Minina M.V.⁴, Chechulina M.V.⁴, Iskandarova F.⁵

¹ Institute of Ion-Plasma and Laser Technologies, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan
33 Durmon yuli st., Tashkent, 100125, Uzbekistan; e-mail: oksengendlerbl@yandex.ru

² Institute of Polymer Chemistry and Physics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan
st. A. Kadyri, 7 "b", Tashkent, 100128, Uzbekistan

³ Webster University, Biological Department
470 East Lockwood Ave., St. Louis, MO 63119-3141, USA

⁴ OLC "NIKA PHARM", Quality Department
7th Sairam Ave., 48 A, Tashkent, 100170, Uzbekistan

⁵ Center for the Prevention of Plague, Quarantine and Especially Dangerous Infections, Ferghana branch
59 Yangi Fargona str., Yangi Margilon city 150113, Uzbekistan

Abstract. The article formulates a hypothesis about the possibility of a unified solution of two fundamental problems of biology on the basis of participation of the Auger effect as a filter in the evolutionary processes; these are a) the inhomogeneity of the elemental composition of living systems in terms of atomic weight (the existence of “leaders” and “outsiders”) and b) the unique stability of homochiral biopolymers with respect to fluctuations of loci of opposite symmetry. We have shown that both paradoxical phenomena can be explained on the basis of one and the same radiation process - Auger cascade after the formation of a vacancy in the K-shell with the subsequent "Coulomb explosion" in the biopolymer, which, however, is impeded by electronic neutralization - "flooding" from the rest of the intact biopolymer chains. It was found that the high damageability is associated with the presence of additional electronic shells, as well as with the existence of chiral deformation of the biopolymer. These two circumstances make it possible to resolve the paradoxes both qualitatively and quantitatively. In particular, the proposed hypothesis explains the existence of carbon life and the impossibility of silicon life. In addition, the enhancement of destruction from the Auger cascade with an increase in the chiral angle revealed special points of the damage to the chiral biopolymer - the contact areas of two domains with different chiralities, which are “washed out” by ionizing radiation with an increased probability, preventing the formation of heterochiral polymers. It is noted that the processes underlying these two paradoxes are, apparently, good examples of the general concept of “complexity”. It is indicated that the Auger cascade is only one of the types of subthreshold radiation physics processes that can explain a number of low-temperature phenomena in biology.

Key words: biopolymers, paradoxes in biology, elemental composition, chirality, radiation, Auger cascade, “Coulomb explosion”, electronic neutralization, “flooding”.

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ФИЛЬТРАЦИИ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА КАЧЕСТВО И ПОЛНОТУ DE NOVO СБОРКИ ТРАНСКРИПТОМА

Мегер Я.В.¹, Лантушенко А.О.¹, Водясова Е.А.^{1, 2}

¹ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

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

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

Поступила в редакцию: 01.08.2020

Аннотация. Для сборки de novo транскриптома существует множество сборщиков, которые имеют различающиеся алгоритмы. В тоже время этап фильтрации, являясь одним из ключевых, также имеет несколько подходов и алгоритмов. Однако, на сегодняшний день работ по изучению влияния степени фильтрации на сборку de novo транскриптома крайне мало. В данной работе были проанализированы транскриптомы, полученные с помощью двух наиболее распространенных программ (rnaSPADES и Trinity), а также применены различные подходы к этапу фильтрации прочтений. Были показаны ключевые различия для двух сборок и выявлены параметры, которые оказались чувствительными к степени фильтрации и длине входных прочтений. Также был предложен эффективный алгоритм фильтрации, который является двухэтапным и позволяет максимально сохранить объем входных данных при необходимом качестве всех прочтений после фильтрации и обрезки.

Ключевые слова: rnaSPADES, Trinity, сборка de novo транскриптома, RNA-seq, фильтрация прочтений

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для более глубокого понимания физиологии процессов, протекающих в организмах при различных условиях, требуется изучение экспрессии генов или целых комплексов генов, как одного из аспектов реакции организма на раздражитель. С развитием и уменьшением стоимости технологий RNA-Seq увеличивается количество исследований, основанных на секвенировании полного транскриптома целого организма, отдельных тканей или клеток [1]. Параллельно развиваются и биоинформатические методы, направленные на улучшение сборок транскриптомов, анализа химер и изоформ, аннотирование контигов и т.д. [2-4]. В случае работы с немодельным или недостаточно изученным объектом, возникает необходимость в сборке de novo без референсного генома. Поскольку большинство метрик оценки качества полученных сборок носят относительный (сравнительный) характер, оценка качества полученного транскриптома без качественного референса является сложной задачей. Эта ситуация осложняется тем, что выбор эффективного и оптимального алгоритма пред- и постобработки полученных прочтений до сих пор остается предметом дискуссий. Существует определенный программный конвейер для сборки de novo (рис. 1). Алгоритмы и их зависимость от входных данных разнятся у различных программ для сборки транскриптомов [5].

Первый этап de novo сборки транскриптомов обязательно включает в себя оценку качества полученных прочтений после секвенирования и их дальнейшую фильтрацию. Подходы на этом этапе отличаются: или стараются максимально очистить полученные транскриптомы от низкокачественных и коротких прочтений, или сохранить все отсекуемые последовательности, или найти компромиссный вариант между достоверностью и полнотой. Данный этап является ключевым, так как качество собранного транскриптома напрямую зависит от входных данных (принцип “garbage in, garbage out”). Одним из факторов, который может

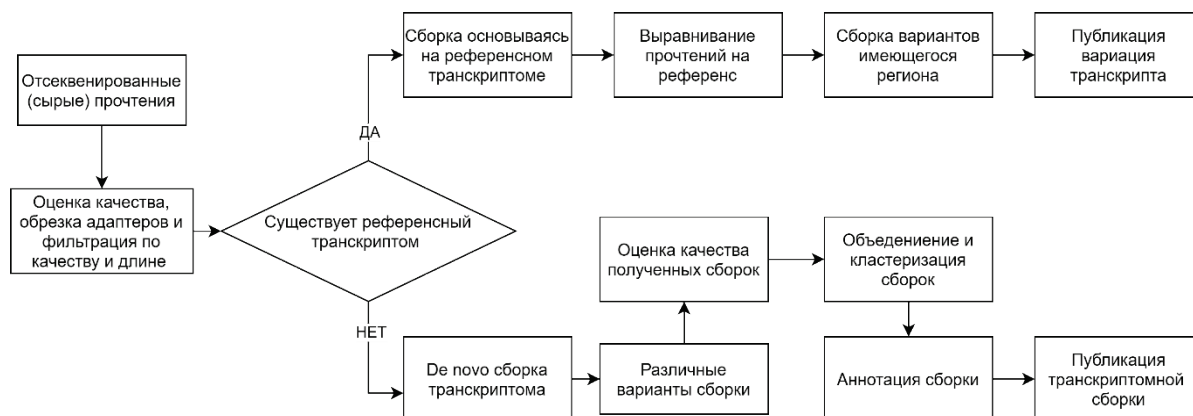


Рисунок 1. Общий алгоритм, применяемый при сборке транскриптома

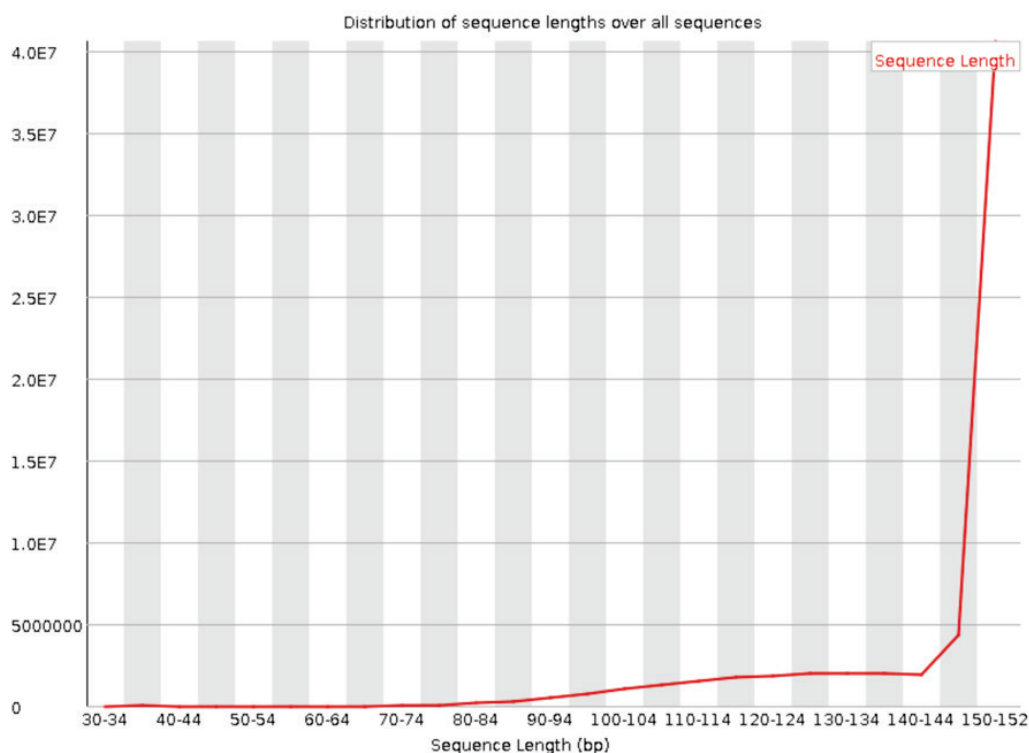


Рисунок 2. Распределение длин прочтений в неотфильтрованном виде

влиять на качество сборки de novo транскриптомов – это длина прочтений после фильтрации, так как длина прочтений является решающей для выбора длины k-меров[6]. Исследований в этом вопросе крайне мало [7].

Таким образом, целью данной работы было изучение влияния различной длины прочтений на качество и полноту сборок de novo транскриптомов с помощью различных сборщиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе сборка проводилась на одно-концевых прочтениях длиной 150 п.н., полученных с помощью NGS-секвенирования суммарной РНК из жаберных тканей *Mytilus galloprovincialis* на платформе Illumina Hi-Seq. Оценка качества прочтений проводилась с помощью программы fastqc [8]. У всех прочтений к концу падало качество и был высокий уровень дубликаций, что связано с наличием в пробах рРНК. В данном случае рРНК не убиралась из массива, и сборка проводилась для полного набора данных. Длина прочтений от 35 до 151, более 90% которых имеет длину более 149, в оставшихся подавляющее большинство в районе 90-140 п.н. (рис. 2).

Обработка прочтений проводилась при помощи программы fastp v.0.20.0 [9] различными методами:

1) Грубая – два этапа фильтрации, отбрасывающий прочтения короче 100 п.н. и обрезкой начала и окончания прочтения в местах падения качества.

2) Средняя – два этапа фильтрации, фильтрация отброшенных прочтений длиной менее 85 п.н., обрезка начала и окончания.

3) Мягкая - два этапа фильтрации, фильтрация отброшенных прочтений длиной менее 65 п.н., обрезка начала и окончания.

4) Минимальная – фильтрация в один этап, с отбрасыванием прочтений короче 50 п.н., обрезкой начала и окончания прочтений и прочтений с низким качеством (GC % <20)

Фильтрация, которая делалась в два этапа, осуществлялась по следующему алгоритму.

1 этап:

Обрезка начала и конца прочтений, фильтрация по качеству (phred >20)

> -q 20 -b 140 -f 10 -n 35 -y -l 80 --failed_out

Однако, таким образом очень сильно обрезалась большая часть прочтений. Поэтому потом отдельно анализировались прочтения, не прошедшие фильтрацию. Там были два кластера по длинам: в районе 70 и 140 нуклеотидов. Каждый кластер нес в себе разные ошибки, поэтому дальнейшая фильтрация была отдельно для каждого диапазона длин (2 этап):

> -Q -A -l 60 --length_limit 80 -b 70 -f 3 -t 2

> -Q -A -l 130 -3 -W 3 -M 30 -b 65 -t 5

После чего все три файла соединяли вместе и делали три варианта отфильтрованных прочтений по минимальной длине: 65, 85 и 100 нуклеотидов.

Было отсекуено 7 транскриптомов, все fastq файлы (в соответствии с минимальной длиной прочтений) были объединены в один и затем проводилась еще раз оценка качества с помощью fastqc.

Таблица 1. Объем входящих прочтений с разной степенью фильтрации

Длина прочтений	35-151 п.н. До фильтрации	50-140 п.н.	65-140 п.н.	85-140 п.н.	100-140 п.н.
Количество прочтений	63 592 364	60 894 123	61 727 260	59 690 644	56 364 226
Доля прочтений от исходного	100	95,8	97,1	93,9	88,6

De novo сборка проводилась тремя алгоритмами, реализованными в транскриптомных сборщиках Trinity v. 2.1.1. [10] и rnaSPADES v3.13.0 [11]. Качество сборок оценивалось программой QUAST v.4.6.3 [12], оценка процента картирования прочтений на сборку, выполнялась в программе Bowtie2 v. 2.3.4.3 [13], предсказание белок кодирующих областей проводилось на основе анализа открытых рамок считывания с помощью программы Transdecoder v. 5.5.0 входящий в пакет Trinity, поиск консервативных генов выполнялся на основе базы генов-ортологов mollusca_odb10 (https://busco.ezlab.org/list_of_lineages) в программе BUSCO v. 4.0.5 [14]. Была проведена кластеризация собранных контигов с использованием Usearch v.11.0.667 [15], процент идентичности выбран 0,95, центроиды выбирались по наибольшей длине.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Суммарный объем прочтений составил 63,6 Gb. Длина прочтений до фильтрации составила от 35 до 151 п.н. (более 90% имело длину более 149 п.н.). При самой грубой чистке из массива данных исключается 11,4% прочтений (табл. 1).

Характеристика полученных сборок с помощью различных сборщиков достаточно сильно различается (табл. 2). Длина наибольшего контига в сборках с использованием Trinity составил 28175 п.н. для всех степеней фильтрации, с использованием rnaSPADES 17500±1000 п.н. Количество контигов в сборках с использованием Trinity в среднем составила ~250 тыс., с использованием rnaSPADES – 170 тыс. контигов. GC состав всех сборок составил 34,8±0,2 %.

Помимо отличий между сборками на основе стандартных характеристик, были выявлены принципиальные отличия и по другим параметрам.

Процент картирования прочтений на сборки для всех вариантов составил 96±2 %, однако количество уникальных выравниваний различается: для сборок с использованием Trinity 16,6±1%, для сборок с использованием rnaSPADES 40±4%.

Поиск консервативных генов по базе mollusca_odb10 для сборок с использованием Trinity показал, что 4655±30 генов найдено из 5295 существующих в базе, с использованием rnaSPADES 4452±40 генов, что соизмеримо между собой (рисунок 4). Если рассматривать число уникальных генов, то опять наблюдается сильное отличие между сборщиками Trinity и rnaSPADES (~1850 и ~3440 соответственно).

Таблица 2. Характеристики полученных сборок QUAST

	Trinity v.2.1.1				
	35-151 п.н.	50-140 п.н.	65-140 п.н.	85-140 п.н.	100-140 п.н.
Количество контигов ≥ 0 п.н.	272 971	246 069	259 251	256 846	248 355
Количество контигов ≥ 500 п.н.	112 757	100 429	106 239	105 782	102 741
N50 (≥ 500 п.н.)	1 790	1 257	1 798	1 799	1 800
Длина наибольшего контига, п.н.	28 175	28 171	28 175	28 175	28 175
GC, %	34,69	34,89	34,74	34,75	34,72
	rnaSpades v.3.13.0				
	35-151 п.н.	50-140 п.н.	65-140 п.н.	85-140 п.н.	100-140 п.н.
Количество контигов ≥ 0 п.н.	174 049	173 267	173 747	173 517	172 288
Количество контигов ≥ 500 п.н.	75 371	66 762	69 790	69 697	69 138
N50 (≥ 500 п.н.)	1 442	1 436	1 439	1 438	1 438
Длина наибольшего контига, п.н.	17 202	17 193	18 672	16 815	16 815
GC, %	34,79	34,89	34,84	34,84	34,83

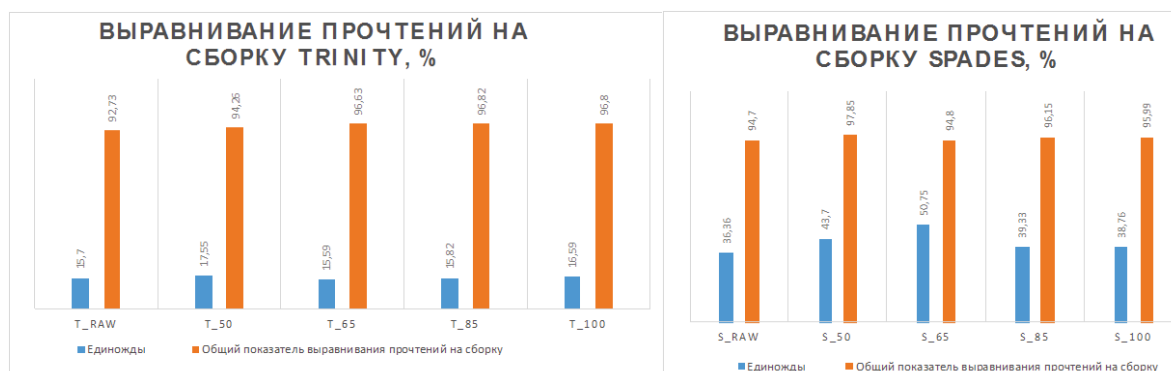


Рисунок 3. Выравнивание прочтений на полученную сборку, выполненное с помощью Bowtie2

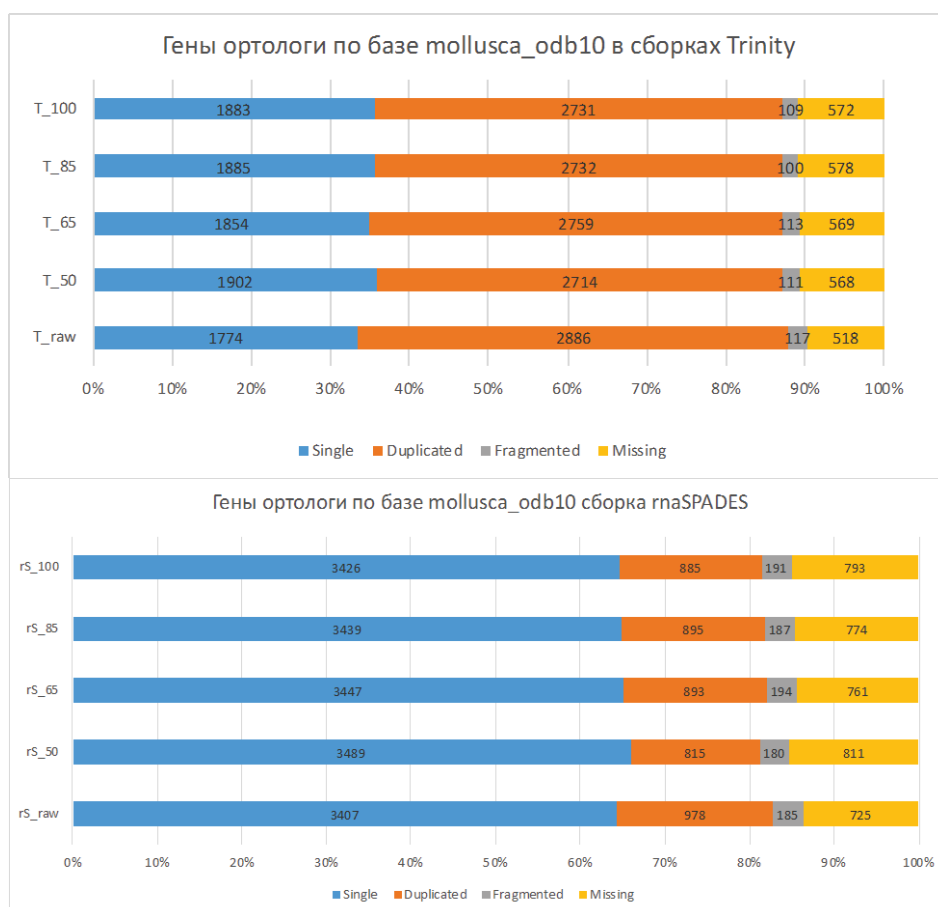


Рисунок 4. Результаты поиска генов-ортологов для всех вариантов сборок с помощью BUSCO

Поиск консервативных генов по базе mollusca_odb10 для сборок с использованием Trinity показал, что 4655 ± 30 генов найдено из 5295 существующих в базе, с использованием rnaSPADES 4452 ± 40 генов, что соизмеримо между собой (рисунок 4). Если рассматривать число уникальных генов, то опять наблюдается сильное отличие между сборщиками Trinity и rnaSPADES (~ 1850 и ~ 3440 соответственно).

Наибольшее отличие между сборщиками продемонстрировал анализ по поиску открытых рамок считывания (ОРС). Для сборок с использованием Trinity было найдено ~ 110 тыс. белок кодирующих транскриптов, с использованием rnaSPADES – 78 тыс (табл. 3). Были обнаружены контиги с 7 рамками считывания. По умолчанию минимальная длина ОРС была оставлена 100 а.к. (300 н.к.). По данным сборок Trinity число предсказанных белков гораздо больше, в тоже время распределение длин ОРС демонстрирует большую частоту коротких мРНК. Так число ОРС с длиной 300 н.к. у сборок Trinity в 2 раза больше, чем у сборок SPADES (рис. 5).

Таблица 3. Характеристики транскриптов с открытыми рамками считывания

	Trinity v.2.1.1				
	35-151 п.н.	50-140 п.н.	65-140 п.н.	85-140 п.н.	100-140 п.н.
Количество предсказанных белков	132 860	120 327	103 075	102 228	99 150
Частота в транскриптах, %	40,07	40,05	39,76	39,80	39,92
Кол-во контигов с ≥ 7 OPC	25	24	0	0	0
Число контигов с 5'UTR и 3'UTR	38 079	34 362	32 273	32 784	31 860
	rnaSpades v. 3.13.0				
	35-151 п.н.	50-140 п.н.	65-140 п.н.	85-140 п.н.	100-140 п.н.
Количество предсказанных белков	86 710	78 481	81 460	81 449	80 636
Частота в транскриптах, %	56,02	51,53	46,84	46,94	46,80
Кол-во контигов с ≥ 7 OPC	12	10	15	17	16
Число контигов с 5'UTR и 3'UTR	21 449	19 078	19 972	19 978	19 749

Число контигов после кластеризации для сборок с использованием Trinity составило $78,1 \pm 0,7\%$ относительно начального количества, с использованием rnaSPADES $94,4 \pm 2,5\%$. После кластеризации, число оставленных контигов стало более одинаково по всем сборкам, диапазон составляет от 168330 до 197879 (в сборках диапазон от 172288 до 272971). Сильно различается кластеризация по сборщикам Trinity и SPADES. Распределение длин центроидов опять же смещено в сторону более коротких у Trinity, при этом максимальная длина также характерна для этого сборщика, что в результате обуславливает почти одинаковую среднюю длину. На рисунке 6 представлено распределение размеров кластеров (такое распределение размеров кластеров наблюдается для всех вариантов фильтрации). При сборке Trinity появляются очень большие кластеры размером до 140 транскриптов, однако число таких кластеров небольшое.

ОБСУЖДЕНИЕ

Отличие между различными сборщиками.

Проведенный анализ выявил определенную закономерность в сборках Trinity и rnaSPADES. Самый длинный контиг в сборке Trinity в 1.6 раза длиннее, чем при сборке SPADES. Такое же соотношение наблюдается для следующих параметров: число контигов, L50, количество предсказанных белков с помощью TransDecoder.

Число контигов, полученных в результате сборок Trinity и rnaSPADES, существенно отличается (на 35%). Тем не менее этот показатель следует рассматривать критично, так как такое число контигов может обуславливаться наличием большого числа химерных контигов и несуществующих изоформ, возникающих в результате сборки, а не свидетельствовать о качестве. Вероятно, сборка Trinity является более полной, но в тоже время более «грязной».

Это предположение подтверждается малым процентом выравнивания прочтений на сборку и огромным числом коротких контигов. Более того, процент транскриптов с открытыми рамками считывания также существенно отличается. Это свидетельствует, что большее число контигов, полученных при сборке Trinity, или слишком короткие (менее 300 п.н.), или являются химерами в результате чего для них не обнаружены OPC длиной более 100 аминокислот.

Кроме того, большее число предсказанных белков (для сборки Trinity) имеет небольшую длину (рис. 5), но среднее значение длин практически одинаковы, что объясняется наличием более длинных контигов в сборках Trinity по сравнению со сборками SPADES (28175 п.н. и 17000 п.н. соответственно).

Тем не менее, с учетом анализа BUSCO и TransDecoder, сборку Trinity нельзя отбрасывать, так как это может повлечь за собой потерю информации о некоторых генах.

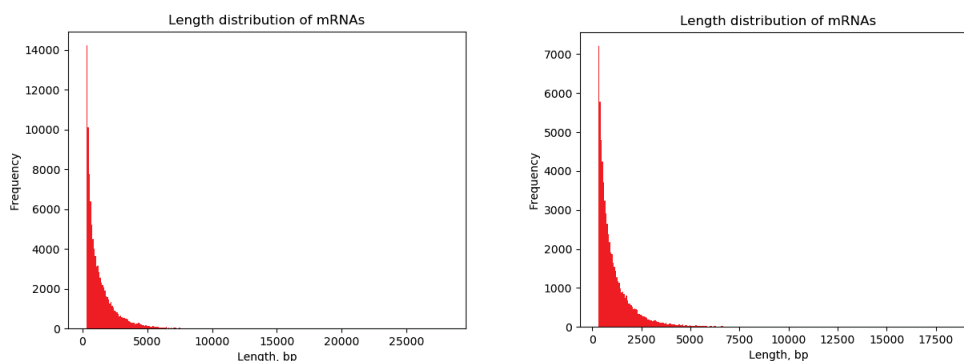


Рисунок 5. Распределение длин мРНК по результатам TransDecoder (Trinity справа, SPADES слева). Графики приведены для сборок с минимальной длиной прочтений в 100 п.н.

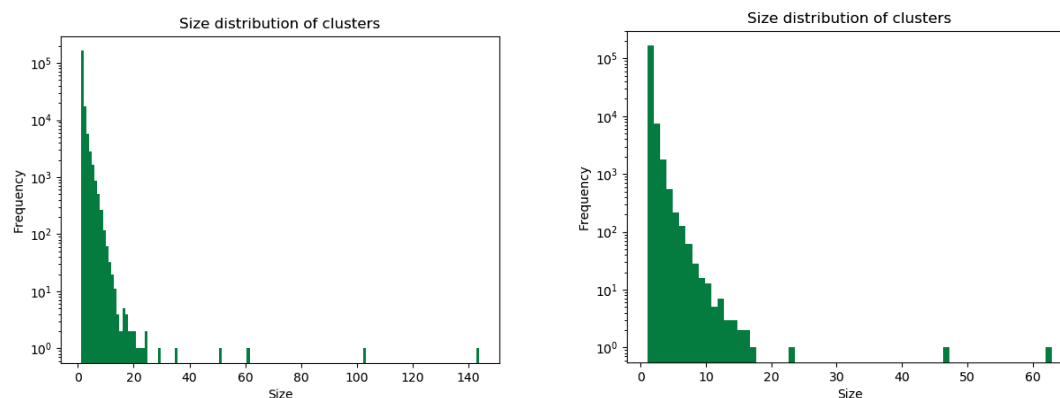


Рисунок 6. Распределение размеров кластеров для Trinity (слева) и SPADES (справа). Минимальная длина прочтений в fastq файле 100 п.н.. Шкала частоты является логарифмической

Отличие в степени фильтрации входных прочтений.

Анализ влияния фильтрации выявил некоторые особенности полученных сборок. Для обоих сборщиков было установлено, что фильтрация в два этапа эффективнее. После первого исключения из массива данных неудовлетворяющих по качеству прочтений и грубой обрезки по концам, повторно анализируя «плохие» прочтения мы часть из них возвращаем в массив данных для дальнейшей сборки. Если мы сравним число оставленных прочтений, то оказывается, что при более узком диапазоне длин (от 65 до 140 п.н.), число прочтений на 3 % больше, чем для длин от 50 до 140 п.н. (табл. 1). Кроме того, для сборки Trinity возрастает при двух этапной фильтрации число собранных контигов, и что самое главное для обоих сборщиков увеличивается число контигов с большей длиной (табл. 2). Последнее особенно заметно при сборке maSPADES. Вероятно, это связано, с возвращением на втором этапе фильтрации в массив прочтений, которые являются крайними участками транскриптов и поэтому могут быть меньшей длины, чем основная часть прочтений. При этом они могут нести важную информацию и при поиске OPC оказаться белок-кодирующими последовательностями. Это предположение подтверждается результатами TransDecoder для maSPADES по увеличению числа предсказанных белков, при этом относительное число контигов с OPC уменьшился (табл. 3). Следует отметить, что количество предсказанных белков у сборки Trinity падает с уменьшением длины. Это отличие между сборщиками является отражением реализованных в них различных алгоритмах и возможным наличием большего числа химер и несуществующих изоформ в сборке Trinity, о чем говорилось выше.

Оценка выравнивания прочтений на сборку выявила зависимость от фильтрации только для сборки maSPADES (рис. 3). Наибольший процент уникальных выравниваний выявлен опять же для двухэтапной чистки прочтений, но с максимально сохраненной длиной (диапазон 60-140 п.н.).

Поиск генов-ортологов не показал явной зависимости от фильтрации для обоих сборщиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с одной стороны, de novo сборка транскриптомов, проведенная с использованием maSPADES больше подвержена влиянию степени фильтрации и отличается меньшей степенью полноты (но возможно большей чистотой сборок), по сравнению с de novo сборкой Trinity. С другой стороны, сборки, полученные с помощью Trinity, имеют большое число химерных контигов и изоформ, что может приводить к трудностям на этапе оценки дифференциальной экспрессии транскриптов и некорректному анализу. Проведенный анализ показал, что для получения референсного транскриптома мы рекомендуем проводить объединение двух сборок (минимальная фильтрация в два этапа, сборщик maSPADES и максимальная фильтрация, сборщик Trinity), так как использование только одной программы для de novo сборки транскриптомов может приводить к искаженным или неполным данным. Кроме того, фильтрацию прочтений следует проводить дважды, максимально стараясь отсечь действительно низкокачественные прочтения, но максимально сохранив весь набор данных.

Работа выполнена в рамках государственной бюджетной темы (№ 0828-2018-0003), при поддержке Министерства образования и науки РФ (грант № 14.W03.31.0015) и внутреннего гранта СевГУ 2020 № 33/06-31.

Список литературы/References:

1. Marinov G.K. On the design and prospects of direct RNA sequencing. *Briefings in functional genomics*, 2017, vol. 16, pp. 326-335.
2. Liu L., Song B., Ma J., Song Y., Zhang S.Y., Tang Y., Wu X., Wei Z., Chen K., Su J., Rong R., Lu Z., de Magalhães J.P., Rigden D.J., Zhang L., Zhang S.W., Huang Y., Lei X., Liu H., Meng J. Bioinformatics approaches for

- deciphering the epitranscriptome: Recent progress and emerging topics. *Computational and structural biotechnology journal*, 2020, vol. 18, pp. 1587-1604.
3. Fu M., Su H., Su Z., Yin Z., Jin J., Wang L., Zhang Q., Xu X. Transcriptome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*-infected spleen of dairy goats. *Microbial pathogenesis*, 2020, vol. 34, pp. 104-120.
 4. Seweryn M.T., Pietrzak M., Ma Q. Application of information theoretical approaches to assess diversity and similarity in single-cell transcriptomics. *Computational and structural biotechnology journal*, 2020, vol. 18, pp. 1830-1837.
 5. Tamames J., Cobo-Simón M., Puente-Sánchez F. Assessing the performance of different approaches for functional and taxonomic annotation of metagenomes. *BMC genomics*, 2019, vol. 20, pp. 960.
 6. Hölzer M., Manja M. De novo transcriptome assembly: A comprehensive cross-species comparison of short-read RNA-Seq assemblers. *GigaScience*, 2019, vol. 8, pp. 247-260.
 7. Longone P. Percolation of aligned rigid rods on two-dimensional triangular lattices. *Physical review. E*, 2019, vol. 100, pp. 52-64.
 8. Andrews S. FastQC: *A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* [Online], 2010. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 9. Chen S. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, vol. 34, pp. 884-890.
 10. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.*, 2011, vol. 29, pp. 644-702.
 11. Bushmanova E., Antipov D., Lapidus A., Prijbelski A.D. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*, 2019, vol. 8, pp. 103-147.
 12. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29(8), pp. 1072-1075.
 13. Langmead B., Wilks C., Antonescu V., Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics*, 2019, vol. 35, pp. 421-432.
 14. Seppey M., Manni M., Zdobnov E.M. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. *Methods in Molecular Biology*, 2019, vol. 6, pp. 19-62.
 15. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, pp. 2460-2461.

INFLUENCE OF THE DEGREE OF SEQUENCING DATA FILTERING ON THE QUALITY AND COMPLETENESS OF THE DE NOVO TRANSCRIPTOME ASSEMBLY

Meger Y.V.¹, Lantushenko A.O.¹, Vodiasova E.A.²

¹ Sevastopol State University

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

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

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

Abstract. There are many assemblers that have different algorithms to assemble a de novo transcriptome. At the same time, the filtering stage, being one of the key stages, also has several approaches and algorithms. However, to date, there is very little work on the influence of filtration degree on the de novo transcriptome Assembly. In this paper, we analyzed transcripts obtained using two of the most common programs (rnaSPADES and Trinity), and applied various approaches to the stage of filtering readings. Key differences were shown for the two assemblies and parameters were identified that were sensitive to the degree of filtering and the length of input reads. We also proposed an effective filtering algorithm that is two-stage and allows you to save the maximum amount of input data with the necessary quality of all readings after filtering and cropping.

Key words: *RNA-seq, rnaSPADES, Trinity, de novo transcriptome assembly, read filtering.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОТОКОЛОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

Дегтяр И.В.¹, Лантушенко А.О.^{1, 2}, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: skuratovskaya95@mail.ru

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

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

Поступила в редакцию: 04.08.2020

Аннотация. В статье рассмотрены методики выделения ДНК из цианобактерии *Arthrospira platensis*. Для контроля чистоты и целостности исследуемой культуры использовался микроскопический и спектрофотометрический анализ. Эксперимент по выделению ДНК проводился по четырём различным протоколам: два с использованием колонок, кислотно-щелочной и с помощью набора «ДНК-экстран». Контроль чистоты выделенной ДНК и определение ее концентрации определялось с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer N60. Наибольшая концентрация выделенной ДНК была получена с использованием кислотно-щелочного метода, при этом наиболее чистые препараты были выделены набором «ДНК-экстран» и на колонках «К-СОРБ».

Ключевые слова: *Arthrospira platensis*, выделение ДНК, спектрофотометрия

Цианобактерии (сине-зелёные водоросли) *Arthrospira platensis* являются ценным источником биологически активных веществ. Биомасса данных цианобактерий содержит около 70% белка и полный набор необходимых аминокислот, примерно 11% липидов, содержащих γ -линоленовую кислоту, около 20% углеводов, а также широкий спектр важнейших микроэлементов и витаминов нужных для жизни человека [1, 2]. Спирулина обладает иммуномодулирующим, иммуностимулирующим и антиоксидантным действием и может корректировать изменение метаболизма, которые возникают из-за неблагоприятных внешних факторов [3]. Вышеперечисленные свойства обусловлены наличием в *Arthrospira platensis* следующих компонентов: с-фикоцианин, аллофикоцианин, β -каротин, хлорофилл a и др. [4].

В молекулярно-биологических исследованиях процедура выделения ДНК является рутинным методом фундаментального и прикладного характера. На сегодняшний день уровень молекулярно-генетических подходов (секвенирование, генотипирование и т.д.) даёт возможность анализировать большое количество организмов с целью обнаружения молекулярной фенотипической изменчивости, полиморфизма, дифференциальной экспрессии генов, устойчивости к стрессовым факторам внешней среды и др.

Исходя из цели работы, в зависимости от объекта исследования используются различные методики выделения ДНК [5,6]. Таких подходов существует несколько [7], а также доступно большое количество реактивов. Важным этапом для большинства работ и предметом для изучения является организация процесса выделения ДНК. Существует множество стандартных протоколов для выделения ДНК из разных объектов исследования, в частности, тканей растений [8], насекомых [9] и человеческой плазмы крови [10].

В данном исследовании был проведен сравнительный анализ четырех различных протоколов выделения ДНК из *Arthrospira platensis*, подобраны оптимальные условия для проведения процедуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Предварительно чистоту и целостность живой культуры *Arthrospira platensis* предварительно оценивали микроскопически с помощью оптического микроскопа МИКМЕД-6 (увеличение 400х и 1000х), также были сняты спектры поглощения культуры на спектрофотометре Unico 2800.

Клеточную суспензию живой культуры *Arthrospira platensis* распределили в 12 центрифужных пробирок. Клетки отделяли от культуральной жидкости при помощи центрифугирования в течение 5 минут при 5000 об/мин. Объем образца в каждой из 12 пробирок после осаждения составил примерно 0,5 мл.

Эксперимент проводился по четырём протоколам выделения ДНК.

1. Методика выделения ДНК на основе протокола с использованием щелочи и кислоты. В полученные 3 образца клеток цианобактерий добавляли 150 мкл реагента щелочного лизиса и полученный раствор отправляли нагреваться до 95°C в течение 5-30 минут. Далее полученную смесь нейтрализовали добавлением 150 мкл кислотного раствора Tris HCl.

2. Методика выделения ДНК на основе протокола Analytik Jena на колонках. По данному протоколу на первом этапе добавляли в 3 пробирки 400 мкл лизирующего раствора и 10 мкл протеиназы. Полученный раствор перемешивали на вортексе. Далее пробирки отправляли в термошейкер и оставляли на 60 минут при 60°C. После охлаждения до комнатной температуры содержимое пробирок центрифугировалось на 11000 об/мин в течение 1 минуты, далее в чистые пробирки переносили надосадочную жидкость. Далее добавляли 400 мкл осаждающего раствора и содержимое пробирки перемешивали на вортексе. Полученный объем переносили на колонку. Центрифугировали в течение 2 минут при 11000 об/мин. Удаляли жидкость из коллектора. На колонку наносили 500 мкл промывочного раствора и центрифугировали на 11000 об/мин 1 мин, удаляли жидкость. Наносили ещё

раз 750 мкл второго промывочного раствора. Повторили центрифугирование и удалили жидкость из коллектора. После этого колонки возвращали обратно в пустые коллекторы и центрифугировали ещё 3 минуты на 11000 об/мин для того, чтобы удалить все следы этанола. Колонки помещали в чистые пробирки и добавляли 200 мкл элюирующего раствора. Смесь инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре и центрифугировали при 11000 об/мин 1 минуту.

3. Методика выделения ДНК на основе протокола набора «ДНК-Экстран» для растений. В 3 пробирки с клетками цианобактерии добавляется 20 мкл лизирующего раствора и с помощью тefлонового пестика производится растирание клеток. Далее добавляли ещё 280 мкл лизирующего раствора и перемешивали. В пробирки помещали по 3 мкл раствора РНКазы и полученный раствор перемешивали на вортексе. Данную смесь инкубировали в течении 1 часа при температуре 60°C. Для осаждения белков к лизату добавляется 100 мкл осаждающего раствора и при помощи центрифуги на 13000 об/мин в течение 5 минут должен образоваться плотный осадок. Супернатант переносится в чистые пробирки и добавляется осаждающий раствор 300 мкл. Смесь перемешивали переворачиванием до появления видимого осадка ДНК. Далее центрифугировали на 13000 об/мин в течение 5 минут. Затем необходимо осторожно слить супернатант и промокнуть пробирки фильтровальной бумагой. Подсушивали пробирки в термостате 10 минут при 37°C до полного испарения спирта. В пробирку добавляли 400 мкл промывочного раствора и перемешивали. Центрифугировали в течение 2 минут на 13000 об/мин. Удаляли супернатант и пробирки промакивали фильтровальной бумагой. Открытые пробирки подсушивали до полного испарения спирта. К осадку добавляли 30 мкл элюирующего раствора, перемешивали и подогревали при 65°C 5 минут до растворения ДНК.

4. Методика выделения ДНК протоколом на колонках «К-СОРБ». В 3 пробирки с клетками спирулины добавили 10 мкл протеиназы К и 200 мкл лизирующего раствора. Содержимое пробирки перемешивали на вортексе и полученную смесь инкубировали при температуре 65°C в течение 15 минут. Далее добавляли 200 мкл осаждающего раствора и содержимое пробирки перемешивали на вортексе. Полученный объём переносили на колонку. Центрифугировали в течение 1 минуты при 8000 об/мин, а затем удаляли жидкость из коллектора. На колонку наносили 400 мкл промывочного раствора и центрифугировали на 8000 об/мин 1 мин и удаляли жидкость. Далее добавляли ещё раз 400 мкл второго промывочного раствора и повторяли центрифугирование, а затем ещё 200 мкл этого раствора и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 2 минут. Колонки переносили в чистые пробирки и добавляли 50 мкл элюирующего раствора. Смесь инкубировали в течение 2 минут и центрифугировали при 8000 об/мин 1 минуту.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 представлены фотографии *Arthrospira platensis*, которые были сделаны на тринокулярном микроскопе МИКМЕД-6 с увеличением 400х и 1000х. Микроскопический анализ свидетельствует о чистоте и целостности исследуемой культуры, о высоком качестве исходных образцов.

Спектры поглощения клеточной культуры, полученные с помощью спектрофотометра Unico 2800, представлены на рисунке 2.

Используя спектрофотометр NanoPhotometer N60 (Implen, Германия), измеряли поглощение ультрафиолетового света в образцах ДНК в диапазоне 200...400 нм. В качестве референса (контроля) использовались элюирующие растворы каждого протокола. Были получены концентрации ДНК (нг/мкл), а также отношения поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (A_{260}/A_{280}) и 260 нм и 230 нм (A_{260}/A_{230}). Коэффициент A_{260}/A_{280} отражает чистоту образца от белков, фенола и других веществ, поглощающих свет на 280 нм, где нормой считается значение порядка 1,8. Второй коэффициент A_{260}/A_{230} отражает чистоту образца от фенолята ионов, тиоцианатов и других органических соединений, норма около 2. Результаты представлены в таблице 1.

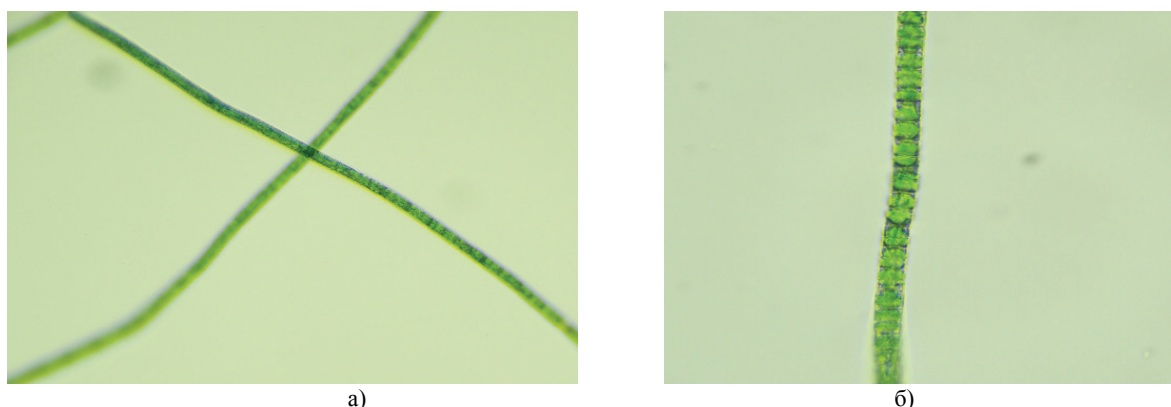


Рисунок 1. Фотографии *Arthrospira platensis*: а) увеличение 400х, б) увеличение 1000х

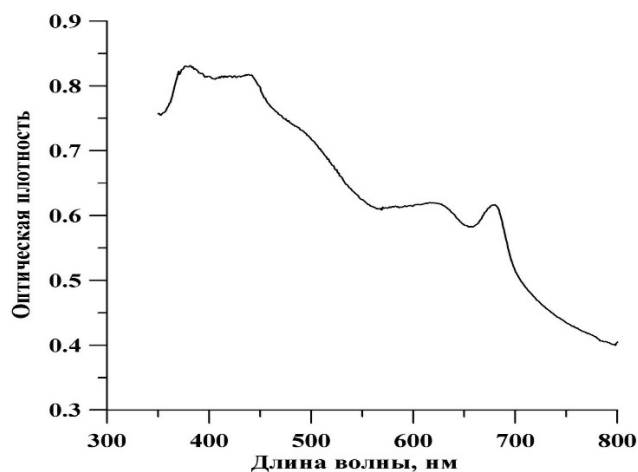


Рисунок 2. Спектр поглощения *Arthrospira platensis*

Из таблицы 1 видно, что наибольшая концентрация выделенной ДНК получается при использовании кислотно-щелочного протокола.

На рисунке 2 представлены спектры поглощения ДНК, выделенной различными видами протоколов.

Спектры поглощения свидетельствуют о том, что использование кислотно-щелочного протокола дает сильно загрязненный образец с высоким содержанием примесей, а применение протоколов «ДНК-экстран» и «К-СОРБ» дает более чистый раствор ДНК, при этом использование протокола «К-СОРБ» позволяет получить концентрацию ДНК, примерно в 5 раз превышающую в протоколе «ДНК-экстран». Далее был проведен гель - электрофорез полученных фрагментов ДНК в агарозном геле. Во всех четырех образцах доминировала фракция

Таблица 1. Концентрации и коэффициенты A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} ДНК, выделенной из *Arthrospira platensis* с помощью различных протоколов

№ образца	Соотношение коэффициентов поглощения A_{260}/A_{280}	Соотношение коэффициентов поглощения A_{260}/A_{230}	Концентрация, нг/мкл
Метод на основе щелочно-кислотного протокола			
1 sample	1,986	0,344	65,75
2 sample	1,976	0,320	73,70
3 sample	1,964	0,371	68,55
Метод на основе протокола Analytik jena			
1 sample	2,154	0,085	44,8
2 sample	2,182	0,564	57,6
3 sample	2,909	0,028	19,2
Метод на основе протокола набора «ДНК-Экстран»			
1 sample	2,136	0,910	7,05
2 sample	2,069	0,764	6,00
3 sample	2,095	0,557	4,40
Метод на основе протокола на колонках «К-СОРБ»			
1 sample	2,160	2,798	37,40
2 sample	2,182	3,283	30,05
3 sample	2,169	2,977	31,15

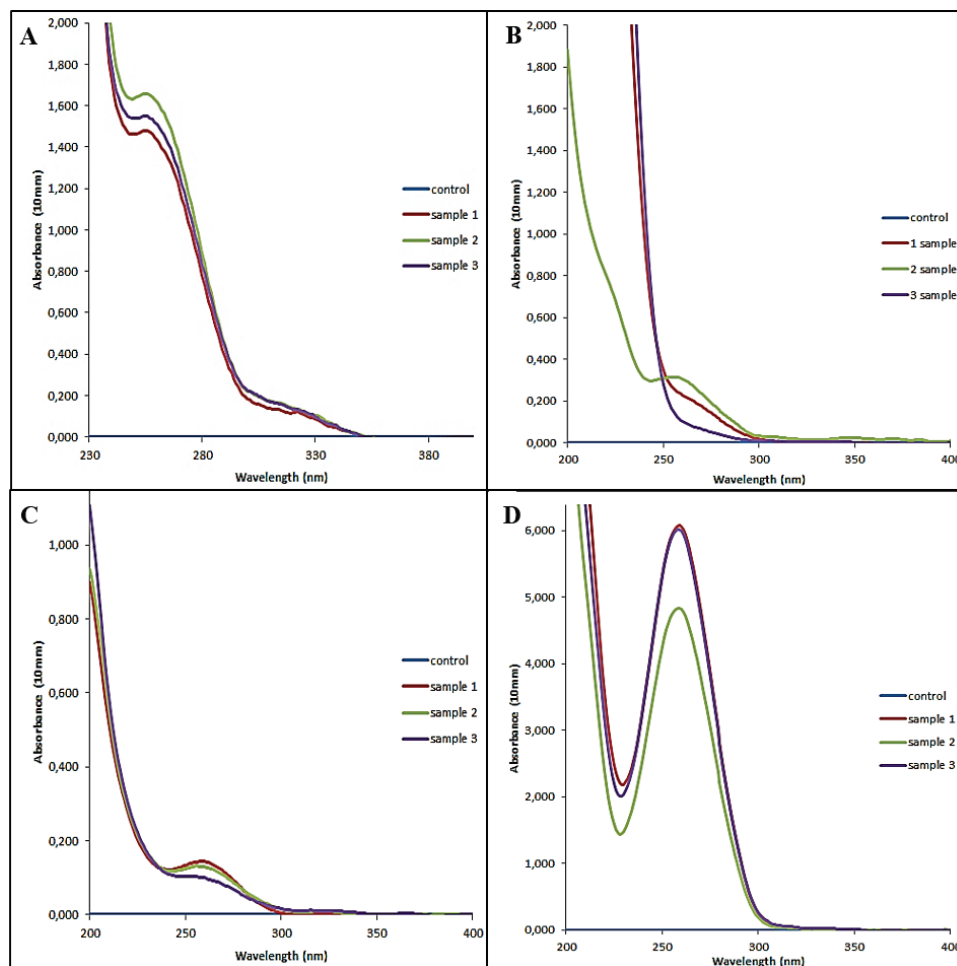


Рисунок 3. Спектры поглощения ДНК *Arthrospira platensis*: А) на основе щелочно-кислотного протокола, В) на основе протокола Analytik Jena, С) на основе протокола набора «ДНК-Экстран», D) на основе протокола на колонках «К-СОРБ»

относительно коротких фрагментов, при этом в электрофореграммах «ДНК-экстран» и кислотно-щелочного протокола также определялись полосы более длинных фрагментов. Таким образом, целесообразность использования протокола определяется дальнейшими целями исследования: для ПЦР-анализа можно использовать самый дешевый кислотно-щелочной протокол, дающий самую высокую концентрацию ДНК. Для дальнейшего секвенирования, предъявляющего высокие требования к чистоте выделенной ДНК, целесообразно применять протокол на колонках «К-СОРБ» или набор «ДНК-экстран».

Работа была выполнена в рамках госзадания № FEFM-2020-0003.

Список литературы / References:

1. Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.*, 1983, vol. 47, pp. 551-558.
2. Reed R.H., Warr S.R.C., Richardson D.L., Moore D.J., Stewart W.D.P. Bluegreen algae (cyanobacteria): prospects and perspectives. *Plan. and Soil*, 1985, vol. 89, pp. 97-106.
3. Khan Z., Bhadouria P., Bisen P.S. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr. Pharm. Biotechnology*, 2005, vol. 5, pp. 373-379.
4. Brown I.I., Karakis S.G., Filippova T.O., Sarkisova S.A., Levitskiy A.P. The physiological effects of phycocyanin crude extract obtained from the G-27 overproducing strain of *Spirulina platensis*. *2nd European Workshop. Biotechnology of microalgae*, 1995, pp. 70-73.
5. Harwood A.J. Basic DNA and RNA Protocols, Methods in Molecular Biology. *New Jersey: Humana Press Totowa*, 1994, vol. 58, pp. 3-7.
6. Moss D., Harbison S.A., Saul D.J. An Easily Automated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Procedure Using a Thermostable Proteinase. *Int. J. Legal Med*, 2003, vol. 117, pp. 340-349.
7. Milligan B.G. Total DNA isolation. *Oxford University Press*, 1998, pp. 29-64.
8. Lutz K., Wenqin W., Zdepski A., Michael T. Isolation and analysis of high-quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. *BMC Biotechnol.*, 2011, vol. 11, p. 54.
9. Hong Chen, Murugesan Rangasamy, Sek Yee Tan, Haichuan Wang, B. D. Siegfried. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS One*, 2010, vol. 5(8).

10. Bravo D., Clari M., Costa E., Muñoz-Cobo B., Solano C., Remigia M.J., Navarro D. Comparative Evaluation of Three Automated Systems for DNA Extraction in Conjunction with Three Commercially Available Real-Time PCR Assays for Quantitation of Plasma Cytomegalovirus DNAemia in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49 (8), pp. 2899-2904.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT PROTOCOLS FOR DNA EXTRACTION FROM ARTHROSPIRA PLATENSIS

Degtyar I.V.¹, Lantushenko A.O.¹, Lelekov A.S.²

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: skuratovskaya95@mail.ru

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

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

Abstract. The article discusses the methods for DNA extraction from cyanobacteria *Arthrospira platensis*. Microscopic and spectrophotometric analysis was used to control the purity and integrity of the culture under study. The DNA extraction experiment was performed using four different protocols: two using columns, an acid-base one, and a set of "DNA-extran". Control of the purity of the isolated DNA and determination of its concentration was determined using the Implen NanoPhotometer N60 spectrophotometer. The highest concentration of isolated DNA was obtained using the acid-base method, while the purest preparations were isolated using a set of "DNA-extran" and "K-Sorb" columns.

Key words: *Arthrospira platensis*, DNA extraction, spectrophotometry.

РАЗВИТИЕ IN VITRO РАСТЕНИЙ ОГУРЦА «КОНКУРЕНТ» НА РАННИХ ЭТАПАХ РОСТА В УСЛОВИЯХ ФОТОРЕСПИРАТОРОГО СТРЕССА

Апашева Л.М.¹, Лобанов А.В.¹, Лукина Н.А.², Сергейчев К.Ф.²

¹ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

г. Москва, РФ

² Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

г. Москва, РФ; e-mail: natlukina1946@yandex.ru

Поступила в редакцию: 04.08.2020

Аннотация. Изучалось развитие растения огурец на ранних этапах роста в герметичных стеклянных сосудах, начиная с проростков семян, развивающихся за счет внутренних ресурсов, запасенных в семени, в отсутствие почвогрунта, в ограниченных объемах воздуха, дистиллированной воды (ДВ) или воды, активированной плазмой СВЧ разряда (ВАП). ВАП получали непрерывной обработкой ДВ струей СВЧ плазмы аргона в течении 30 минут в открытой атмосфере. При СВЧ мощности 0,9 кВт температура плазмы аргона ~4000°K. ВАП представлял собой водный раствор пероксида водорода с концентрацией $[H_2O_2] \approx 4 \times 10^{-3} M$ и окислов азота концентрацией $[NO_x] \approx 7 \times 10^{-4} M$; посторонних примесей в виде окислов металлов и др. не содержит. Условия опытов постоянные: температура 20°C, освещение свет/темнота 12/12 час. Сосуды не вскрывали на протяжении 40 суток. Показано, что растения, выращенные на ДВ доживали максимум до 15 суток, тогда как, выращенные на ВАП с разведением в 100 и 500 раз увеличивает продолжительность жизни в ~3 раза. ВАП способствует быстрому ускоренному развитию растений, увеличивает объем зеленой массы, продолжительность жизни, служит дополнительным по отношению к ДВ источником кислорода и азота. ВАП же разбавленный в 10 раз с $[H_2O_2] = 10^{-4} M$ блокирует рост растений. Сравнение веса сухих семян и веса высушенных растений по окончании эксперимента, показало, что основным источником для роста и развития растений в замкнутом объеме оказался углерод, запасенный в самом семени.

Ключевые слова: плазма, активированный, замкнутый объем, пероксид, концентрация, проросток.

Выращивание растений *in vitro* было продемонстрировано Д. Латимером [1], который хотел проверить, могут ли растения развиваться и расти в автономной среде. Его «бутылочный сад» прожил 53 года с однократным поливом на необновляемом почвогрунте. Из четырех саженцев, посаженных в огромную шаровидную 45-литровую бутылку, куда он добавил 0,14л воды и закупорил, прижилась лишь одна (традесканция) и продолжал расти. «Растение внутри процветало, наполняя шаровидную бутылку здоровой листвой». Через 12 лет он открыл растение, полил его небольшим количеством воды и снова закупорил. Все, что растение получало извне – был солнечный свет, который был нужен для фотосинтеза растений и выработки питательных веществ. Для равномерной инсоляции бутылку с растением поворачивали. Традесканции известны тем, что являются особенно «выносливыми» растениями. Вокруг этого эксперимента не утихают споры о возможности столь долговременной жизнеспособности автономной экосистемы.

Экосистема Д. Латимера могла существовать, вероятно, благодаря симбиозу фотосинтеза растения, поставляющего в замкнутую атмосферу кислород, и клеточного дыхания почвенной микрофлоры, выделяющей углекислый газ. Отмирающие листья растения и кислород были питательной средой бактерий, которые выделяли двуокись углерода, необходимого растению для фотосинтеза и роста. Вода, выделяемая растением вместе с кислородом, конденсировалась на листьях, стенках бутылки и возвращалась к корням в почву. Повторяющиеся суточные циклы жизни растений сопровождался круговоротом воды, кислорода и двуокиси углерода. Нужные для роста растения минералы заимствовались из почвы. Эта живая замкнутая экосистема действовала в соответствии с законом сохранения материи.

Целью настоящей работы было, изучить развитие растений на ранних этапах роста *in vitro* в замкнутом стеклянном сосуде, начиная с проростков, в отсутствие почвогрунта, в присутствии лишь ограниченных объемов дистиллированной воды и воздуха с начальным давлением, равным нормальной атмосфере. Опыты проводились в одинаковых условиях с двумя разными типами воды: дистиллированная вода (ДВ) и дистиллированная вода, активированная плазмой СВЧ разряда (далее ВАП). Задачами экспериментов было:

1. Выяснить способность проростков выбранного вида расти и развиваться за счет внутренних ресурсов, запасенных в семени;
2. Сравнить скорости роста с указанными типами воды при одинаковых внешних условиях по температуре и освещенности и разными по концентрации растворами ВАП.

Материалы и методы.

Для выращивания растений в замкнутом объеме использовали стеклянные культуральные сосуды с притертыми крышками, которые для надежной консервации заливали парафином. В каждом опыте велся учет следующих параметров (в пересчете на одно выращиваемое растение):

1. объем воздуха;
2. площадь дна сосуда;

3. количество воды (ДВ) и раствора ВАП.

Внешние условия опытов: температура $+19\pm 21^\circ\text{C}$; освещенность 400 Лм с цикличностью: свет/темнота 12/12 часов.

Опыты проводились с семенами огурца «Конкурент», регистрационный номер 7605854, в Гос. реестре селекционных достижений [2], сорт раннеспелый, устойчивый к мучнистой росе. Средние весовые характеристики испытуемых семян в расчете на 5 растений: сухих семян – 0,14 г, наклюнувшихся – 0,2 г, вес проростков с начально раскрытым листом – 0,5 г.

В экспериментах использовались: вода дистиллированная и ВАП, полученная непрерывной обработкой дистиллированной воды струей плазмы аргона в течение 30 минут в открытой атмосфере при мощности СВЧ-плазмотрона 0,9 кВт, температура плазмы аргона 4000 К. Исходный состав ВАП представляет собой водный раствор пероксида водорода H_2O_2 с концентрацией $4\times 10^{-3}\text{M}$ (измерено методом йодометрии [4]) и нитратов NO_x , с концентрацией $7\times 10^{-4}\text{M}$, определенной по проводимости раствора [5]. Вклад H_2O_2 в общую проводимость раствора ничтожно мал и не учитывался. Посторонних примесей в виде окислов металлов и др. ВАП не содержит. В опытах использовались растворы ВАП различного разведения от 10 до 1000 раз

В сосуды на дно наливали порцию воды или раствора ВАП, в одном из опытов закрывали слоем фильтровальной бумаги и сверху помещали наклюнувшиеся семена, которые предварительно замачивали в течение 24 часов в дистиллированной воде. Сосуды не вскрывали на протяжении 40 суток до окончания опытов. Регулярно вели наблюдение за развитием растений. Отмечали время появления первого свободного зеленого листа, время появления и исчезновения водного конденсата на стенках сосудов, изменение высоты проростков, а к окончанию опытов - потерю тургора и начало побурения листьев,

Эксперимент.

Опыт 1.

Наклюнувшиеся семена огурца в количестве 5 штук высажены в культуральные сосуды со следующими параметрами в пересчете на 1 растение:

Площадь дна 1,4 см

Объем воздуха 4,4. мл

Количество ДВ (в контроле) и раствора ВАП 0,2 мл. Растворы ВАП в опытах, разводились в 20, 50, 100, 500 и 1000 раз.

При разведении ВАП в 10 раз растения не развивались с самого начала опыта вследствие эффекта блокировки из-за высокой концентрации раствора. При разведении ВАП в 100 и 500 раз (таблица 1) семядольный зеленый лист появился на 3 сутки у половины растений, тогда как в ДВ и при разведении ВАП в 1000 раз появление листа произошло к 5 суткам только у 1/5 части растений, при этом их число по сравнению с 3 сутками возросло в 1,5-2 раза. На 5 сутки также наблюдалось появление конденсата на стенках сосуда, причем наиболее обильный конденсат был в случаях разведения ВАП в 100 и 500 раз. На 8 сутки все растения с разведением ВАП в 100 и 500 раз достигли высоты 2 см, тогда как в контроле с ДВ и разведением ВАП в 1000 раз до 2 см выросла только пятая часть растений. К 25 суткам половина растений с разведением ВАП 100 и 500 потеряли тургор и более 4/5 их числа приобрели бурый окрас уже на 30 сутки. Почти все растения с ДВ и с 1000- кратным разведением ВАП побурели на 25 сутки.

Опыт 2.

Этот опыт был поставлен при увеличенных параметрах объема воды и раствора более, чем в 3 раза, а по объему воздуха – в 1,25 раза. Разведение ВАП в 1000 раз было исключено, так как сравнению с ДВ слабый раствор не показал заметного влияния на развитие растений, но были добавлены разведения ВАП в 20 и 50 раз.

Наклюнувшиеся семена огурца в количестве 5 штук высажены в культуральные сосуды со следующими параметрами в пересчете на 1 растение:

Площадь дна 1,7 см;

Объем воздуха 5,5 мл;

Количество ДВ (в контроле) и раствора ВАП 0,65 мл, Растворы ВАП в этом опыте, разводились в 20, 50, 100, 500 раз. На дно сосудов положены стандартные химические бумажные фильтры, толщиной 1 мм для фиксации корней в горизонтальном положении.

Таблица 1. Этапы развитие растений в ВАП с разведением 100, 500 и 1000 в течение 30 суток

t , сутки	3	5	8	25	30
Коэффициент разведения раствора ПАВ	Появление свободного листа		Высота растений, см	Потеря тургора	Побурение листа
	Количество живых. растений, %				
ДВ (контроль)	20	40	20	90	100
100	50	100	100	50	90
500	50	100	100	60	80
1000	20	30	20	100	100

Таблица 2. Этапы развития растений в ВАП с разведением 20, 50, 100 и 500 раз в течение 40 суток

<i>t</i> , сутки	4	10	18	35	40
Коэффициент разведения раствора ВАП	Появление свободного. листа	Высота растений, см			
		3,5	5,5	6,0	6,0
	Количество живых растений, %				
ДВ (контроль)	30	20	нет	нет	нет
20	35	20	40	Потеря зеленого окраса и тургора	нет
50*	90	50	75		нет
100*	100	70	90	30	20
500*	100	70	90	20	20

На 4 сутки опыта наблюдалось появление свободного листа у всех растений и образование конденсата на стенках сосуда, наиболее насыщенное при коэффициентах разведения ВАП 50, 100 и 500, помеченных (табл. 2) знаком (*). При разведении в 20 раз и в ДВ появление свободного листа на 4-е сутки состоялось лишь у 1/3 растений, дальнейший рост которых был слабым, К 15-м суткам у них побурели листья (потеря зеленого окраса), в итоге растения с ДВ не дожили до 18-х суток. Явная потеря зеленого окраса листа и потеря тургора у растений зафиксированы к 35 суткам в ВАП с 20 и 50-кратным разведением. К 40 суткам опыта живые растения до 20% сохранились лишь в растворах ВАП со 100- и 500-кратным разведениями. Максимальная высота растений к 25 суткам достигла 6 см в ВАП с разведением в 100 и 500 раз, но у 30% растений. Высота растений была лимитирована высотой сосуда.

Обсуждение результатов опытов

Из опытов можно сделать несколько выводов:

- Семена растений, начинающие прорастать (проростки) можно доращивать до размеров рассады в замкнутом, изолированном от окружающей среды объеме аналогично «бутылочному саду» Д. Латимера с тем отличием, что культуральный сосуд содержит лишь дистиллированную воду (а или воду, активированную плазмой СВЧ разряд (б), и не содержит почвогрунта и питательных добавок.
- На 3-5 сутки в обоих вариантах опыта (а) и (б) наблюдалось появление свободного листа, но в варианте (а) только у 30% растений, а в варианте (б) уже у 100% растений при оптимальном разведении раствора ВАП от 100 до 500 раз, что соответствует значениям концентрации $[H_2O_2]$ от 4×10^{-5} М до 8×10^{-6} М.
- Раствор ВАП, разбавленный в 10 раз: $[H_2O_2] = 4 \times 10^{-2}$ М блокирует рост растений.
- Процесс фотосинтеза начинается с появлением зеленого листа, сопровождается периодическим выпадением конденсата, а исчезает с прекращением фотосинтеза, при гибели растения.
- Растения, выращенные на ДВ (а) доживали максимум до 15 суток, тогда как, выращенные на ВАП с разведением в 100 и 500 раз (б), доживали до 40-х суток, к 35-м суткам их высота достигала высоты сосуда 6 см.
- ВАП способствует быстрому развитию растения и увеличивает продолжительность его жизни. Служит также дополнительным по отношению к воде источником кислорода.
- Увеличение объема воды во 2-м опыте дает увеличение объема зеленой массы.
- Взвешивание культуральных сосудов в начале и в конце опытов подтвердило постоянство их весов, т.е. соответствие закону сохранения материи.

Объем воздуха, заключенного в изолированном культуральном сосуде, не обеспечивает процесс фотосинтеза двуокисью углерода, которого в атмосфере сосуда содержится не более 0,04%, т.е. $1,75 \times 10^{17}$ – $2,2 \times 10^{17}$ молекул. Известно, что наибольшая массовая доля в растениях приходится на органогенные элементы: углерод 45%, кислород 42%, водород 6,5%, азот 1,5. Т.е., если вода перешла в биомассу растений, то 1/2 веса должен составлять углерод. Масса атома углерода $\sim 2 \times 10^{-23}$ г. Общее число атомов углерода в биомассе растений должно достигать значений порядка 10^{23} , столько же молекул двуокиси углерода должно было быть заимствовано из объема воздуха (у нас объем воздуха в сосуде 4,4 мл). Разница составляет почти 6 порядков. Возникает вопрос об источнике углерода в замкнутом сосуде. Сравнение веса 10 сухих семян (0,28 г) и 10 высушенных растений (0,275 г) по окончании эксперимента (по прошествии 23 суток), показало, что вес практически не изменен. Это говорит о том, что основным источником для роста и развития растений в замкнутом объеме оказался углерод, запасенный в самом семени.

Список литературы / References:

1. Anna Norris. Man's Thriving Garden, Sealed in a Bottle, Hasn't Been Watered in Decades. *Home and Garden*, 2016.
2. Гос. реестре селекционных достижений. State breeding achievement register. <http://reestr.gossotr.ru>
3. Андреев С.Н., Апашева Л.М., Лобанов А.Б., Лукина Н.А., Савранский В.В., Сергейчев К.Ф. *Способ плазменной активации воды или водных растворов и устройство для его осуществления*. Патент РФ № 2702594, публикация от 08 октября 2019 г. [Andreev S.N., Apasheva L.M., Lobanov A.B., Lukina N.A., Savranskij V.V., Sergejchev K.F. *A method for plasma activation of water or aqueous solutions and a device for its implementation*. RF Patent No. 2702594, publication dated October 08, 2019. (In Russ.)]

4. Lobanov A.B., Rubtsova N.A., Vedeneeva Yu.A., Komissarov G.G. Photocatalytic activity of chlorophyll in the formation of hydrogen peroxide in water. *Reports of the Academy of Sciences*, 2008, vol. 421 (6), pp. 773-776.
5. CRC Handbook of Chemistry, and Physics. 70th Edition, Weast, R.C., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p. D-221.

DEVELOPMENT OF CUCUMBER PLANT *IN VITRO* ON EARLY GROWTH STAGES UNDER CONDITIONS OF PHOTORESPIRATOR STRESS

Apasheva L.M.¹, Lobanov A.V.¹, Lukina N.A.², Sergeichev K.F.²

¹ Semenov Chemical Physics In-t of the Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia

² Prokhorov General Physics In-t of the Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia; e-mail: nathukina1946@yandex.ru

Abstract. The development of the cucumber plant was studied in the early stages of growth in sealed glass vessels, starting with seedlings developing from internal resources, stored in the seed, in the absence of soil, in limited volumes of air, distilled water (DW) or water activated by microwave discharge plasma (VAP). VAP was obtained by continuous treatment of DW with a stream of microwave argon plasma within 30 minutes in an open atmosphere. At a microwave power of 0.9 kW, the Argon plasma temperature is ~4000oK. VAP was an aqueous solution of hydrogen peroxide with a concentration of $[H_2O_2] = 4 \times 10^{-3}$ M and nitrogen oxides with a concentration of $[NO_x] \approx 7 \times 10^{-4}$ M; does not contain foreign impurities in the form of metal oxides, etc. Experimental conditions are constant: temperature 20 °C, lighting light/dark 12/12 hours. The vessels were not opened for 40. It was shown that plants grown on the Far East survived up to a maximum of 15 days, while those grown on VAP with a dilution of 100 and 500 times increases the lifespan by ~3 times. VAP promotes the rapid accelerated development of plants, increases the volume of green mass, life expectancy serves as a source of oxygen and nitrogen as an additional source of oxygen and nitrogen in relation to DV. VAP diluted by a factor of 10: with $[H_2O_2] = 10^{-4}$ M blocks plant growth. Comparison of the weight of dry seeds and the weight of dried plants at the end of the experiment showed that the main source for the growth and development of plants in a closed volume was the carbon stored in the seed itself.

Key words: plasma, activated, closed volume, peroxide, concentration, sprout.

MODELING REACTION KINETICS OF ZNO MICROPARTICLES SYNTHESIZED VIA MICROWAVE: AB INITIO SIMULATION

Mendoza-Báez R., Morales M.A., Luna-Flores A., Agustin-Serrano R.,
Cervantes-Tavera A.M., Hernandez-Santiago A.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

Puebla, Mexico

Received: 20.07.2020

Abstract. The nucleation and growth mechanisms of nanoparticles and micro-particles of semiconductor materials has not been fully disclosed and for sure. Therefore, a theoretical and experimental experiment is proposed to investigate in a first stage the nucleation mechanism through the reaction mechanism. Zinc oxide micro-particles were synthesized from zinc acetate dihydrate and sodium hydroxide in the presence of ethanol in aqueous medium, via a microwave-assisted hydrothermal method. The subjacent molecular mechanism of the experimental process was researched by *ab initio* calculations with the 3-21G basis set. We found that the microwave radiation system is crucial during the synthesis for the nucleation mechanism of zinc oxide microparticles, since it provides the necessary energy to carry out the endothermic reaction where the $Zn(OH)_4^{2-}$ complex is produced, which in turn, through an exothermic and spontaneous reaction for the obtaining of zinc oxide (ZnO) as product of the reaction mechanism. SEM micrographs of the resulting microparticles show that ZnO has a branched morphology and the XRD pattern exhibit a crystal size to nanometric scale (31.3 nm). Both theoretical and experimental results support the kinetics of the proposed reaction mechanism.

Key words: Reaction-mechanism, dioxide zinc, microwaves, AB INITIO, branched morphology.

INTRODUCTION

New micro and nanostructured materials based on metals and metal oxides are currently under investigation due to their wide applications such as photo-catalytic degradation [1, 2], antibacterial compounds [3] and solar energy [4]. Thus, many investigations have focused on knowing the critical variables on which the conformation of a certain morphology depends, for example, micro and nanoparticles in the form of tubes, wires, flowers, stars, discs, clusters, leaves, needles, boxes, walnuts, cubes [5, 6], among other geometries. For example, branched nanostructures such as silver phosphate have an improved photocatalytic activity, compared to the geometric structures mentioned above. [7].

In particular, zinc oxide is an important material because it possesses excellent optical, electrical and microstructural properties [8-10], making it a good candidate for applications in visible and ultraviolet light emitters, transparent field-effect transistors, photodetectors, solar cells, sensors and piezoelectronic devices [11-14]. There are different synthesis methods to obtain ZnO nanostructures such as the sol-gel method, spray pyrolysis, liquid combustion reaction, hydrothermal synthesis, chemical vapor deposition (CVD), the Pechini method [15-19] and, currently, bio-mediated synthesis [20]. Many researchers have employed *ab initio* methods to study the electronic and structural properties of different ZnO structures, however, it is always at the unit cell level or crystal structure level [21-23]. In this research work, *ab initio* calculations were performed to theoretically confirm the proposed reaction kinetics based on experimental synthesis assisted by microwave, considering zinc oxide as a product of reaction kinetics. The reaction mechanism obtained provides an explanation of the nucleation mechanism. This work is the basis for future studies on multiscale modeling of nucleation and growth of branched (fractal) structures.

MATERIALS AND METHODS

The synthesis of zinc oxide microparticles (ZnOMPs) was carried out using zinc acetate dihydrate ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2(H_2O)$) $\geq 99\%$ purity (J.T.Baker) and sodium hydroxide (NaOH) $\geq 98\%$ (J.T.Baker) as precursor and catalyst, respectively. Furthermore, to carry out the synthesis, methanol (CH_3OH) $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich) was used as reagent and distilled water as solvent. The zinc oxide microstructures were synthesized using the microwave assisted hydrothermal method. First, a 0.2 M solution of zinc acetate dihydrate in methanol (Sol1) was prepared, which was subjected to mechanical stirring for ~ 10 min. Then, another 1.0 M solution (Sol2) of sodium hydroxide in distilled water was prepared. Without stopping the stirring of Sol1, Sol2 is added and the stirring is continued for 60 minutes. After the stirring time of the Sol1-Sol2 mixture, it is subjected to microwave radiation for 10 minutes at 50% of the equipment power (Fig. 1). Finally, the resulting solution is centrifuged at 300 rpm for 10 minutes, obtaining two phases: a liquid phase at the top and the solid phase of the synthesized ZnO deposited at the bottom of the centrifuge tube. The microwave radiation equipment is a modified conventional microwave from the brand Daewoo model KOR-662M.

1.1 Computational Details.

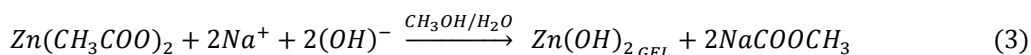
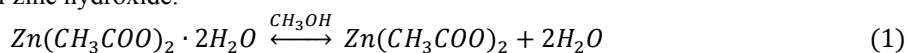
To theoretically evaluate the thermodynamic parameters of all the chemical species involved in the reaction mechanism, all structures were optimized with Hartree-Fock methods, using the 3-21G basis set [24,25] implemented in the package of Gaussian program 09 [26]. Using the conductor-like polarizable continuum model (CPCM) [27,28], the

Figure 1. Microwave radiation system with arrangement of the Sol1-Sol2 mixture and cooling system on top of equipment

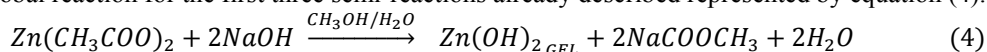
total energies of the molecules of reagents, products and transition states in solvent water and methanol were calculated, since all reactions occur in the presence of these two species from the dissociation of the precursors to the final product. For each of the half-reactions, the Gibbs free energy ($\Delta_r G^\circ$) and the reaction enthalpy ($\Delta_r H^\circ$) were obtained. Frequency calculations were performed at the same theoretical level (HF 3-21G / CPCM) to check the nature of stationary points on the potential energy surface (PES), obtaining no imaginary frequencies for both reagent molecules and transition states. Recent studies maintain the same level of theory for geometric optimizations and for frequency calculations [29-31]. In addition, the frequency calculations obtained the thermodynamic parameters zero-point energy (ZPE), thermal contributions to enthalpy (ΔH), Gibbs free energy (ΔG) and entropy (ΔS), at a temperature equal to 298 K. Data analysis was done using GaussView 6.0 (Gaussian, Inc.).

1.2 Reaction Mechanism.

The synthesis process of ZnOMPs begins with the preparation of Sol1 and Sol2 corresponding to the dehydration of $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and the dissociation of NaOH, respectively, as shown in equations (1) and (2) (Figure 2). Zinc acetate dihydrate fails to fully dissociate into Zn^{2+} and $(\text{OH})^-$ because methanol is not polar enough, unlike water. Then, when mixing both solutions (Sol1-Sol2), the dissociation of zinc acetate occurs by reaction with the Na^+ and $(\text{OH})^-$ ions previously dissociated in Sol2, as shown in equation (3) (Figure 3), obtaining as zinc hydroxide product ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) and sodium acetate (NaCOOCH_3). Bari *et al.* [32] describe that zinc hydroxide acetate is an intermediate of the hydrolysis reaction, formed in the presence of H_2O molecules and ions $(\text{OH})^-$, which can be easily transformed into ZnO at higher temperatures and with prolonged reflux, while sodium acetate is soluble in water and could therefore be removed from the final product. Yung *et al.* [33] mention that the abundance of electrons in the oxygen atoms causes the hydroxyl (OH) groups of the alcohol molecules to bind with the zinc ions. On the other hand, Haase *et al.* [34] also reported that it is favorable to use alcohol as a solvent, since it helps react the Zn^{2+} ions and NaOH, due to the dehydrating property of the alcohol, preventing the formation of zinc hydroxide.



Therefore, there is a global reaction for the first three semi-reactions already described represented by equation (4).



The precipitation mechanism proposed by Wu *et al.* [35] explains that $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ can be converted to colloidal $\text{Zn}(\text{OH})_2$ under an alkaline solution with a pH value between 13 and 14. Usually, in a synthesis using the sol-gel technique, there is a hydrothermal process where part of the colloids $\text{Zn}(\text{OH})_2$ dissolves in Zn^{2+} and $(\text{OH})^-$ as shown in equation (5) (Figure 4.a). Then, an anionic complex of zinc coordinate to four hydroxyl radicals ($\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$) is formed, denoted in

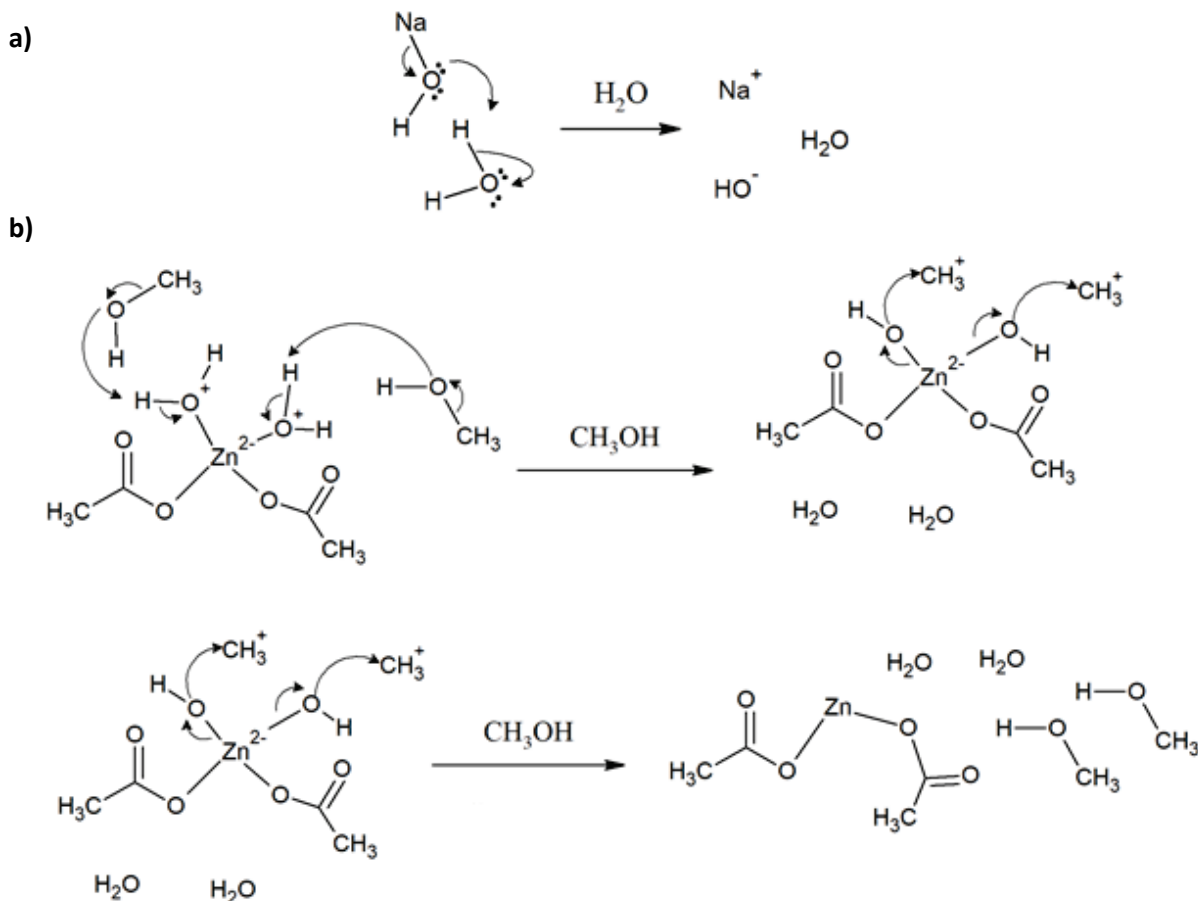


Figure 2. Reaction mechanisms proposed for a) dissociation of NaOH in aqueous medium and b) dehydration of $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ in methanol

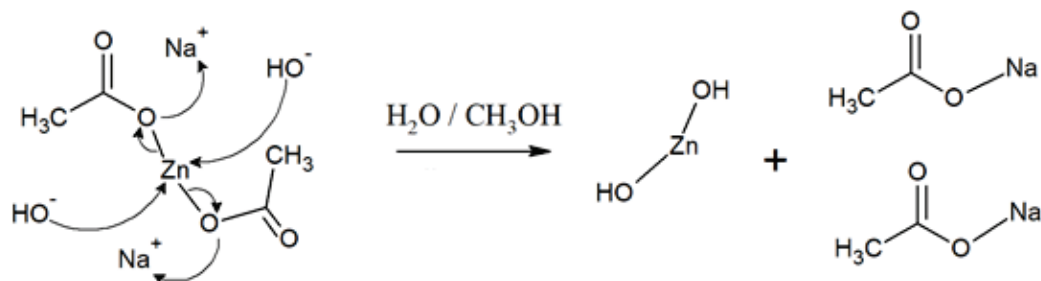
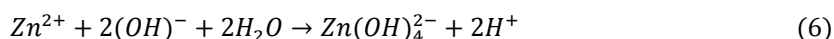
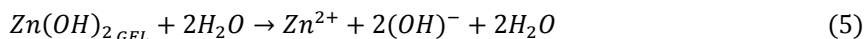
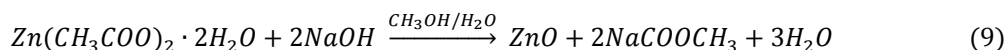
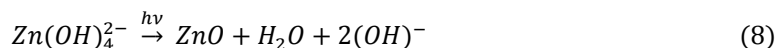
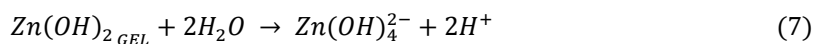


Figure 3. Reaction mechanism in the Sol1-Sol2 mixture, production of $\text{Zn}(\text{OH})_2$

equation (6) (Figure 4.b). When the concentration of Zn^{2+} and $(\text{OH})^-$ reaches the degree of ZnO supersaturation, ZnO nuclei will be formed according to the reaction of equation (8), going through an intermediate complex proposed by Smith *et al.* [36] called oxodihydroxyzincate, $\text{ZnO}(\text{OH})_2^{2-}$ (Figure 4.c). Finally, adding all the semi-reactions in a global reaction, equation (9) is obtained.



Equation (7) is the sum of half-reactions (5) and (6):



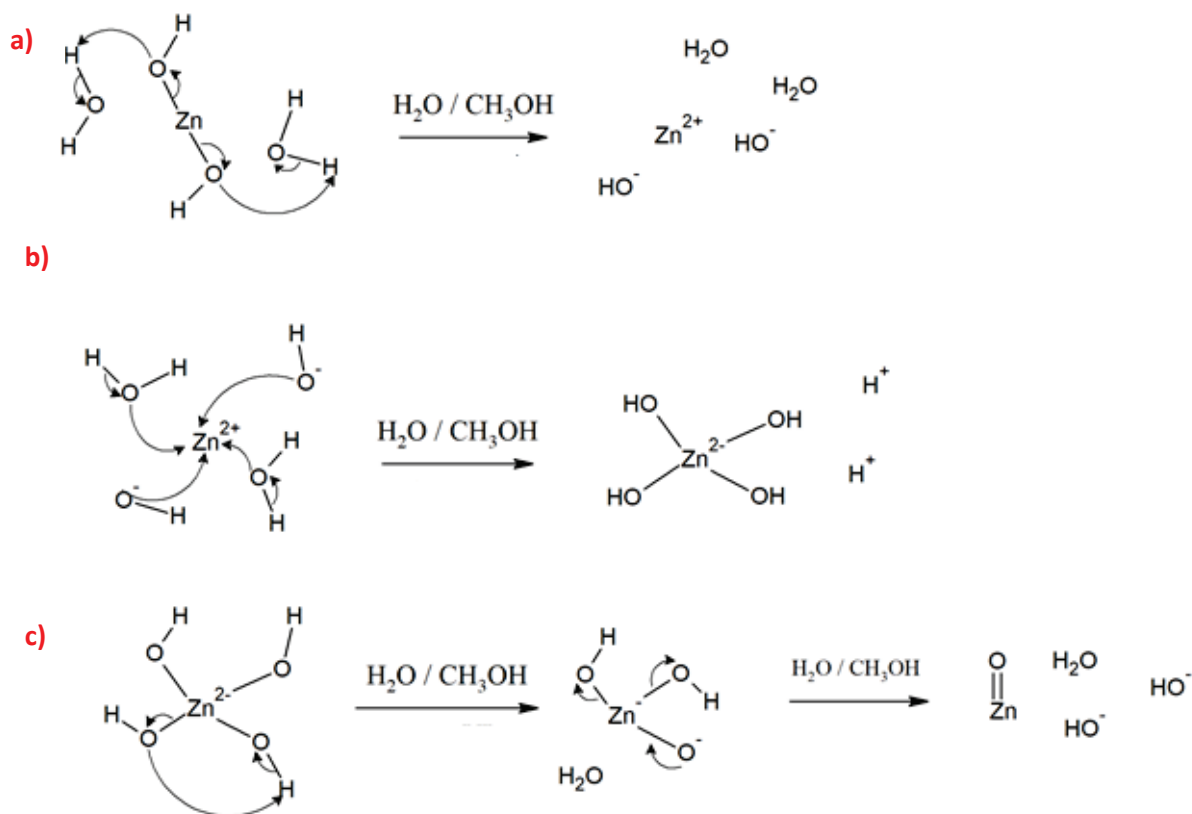


Figure 4. Reaction mechanisms of a) dissociation of zinc hydroxide, b) formation of the coordinated zinc anion complex, and c) obtaining ZnO

Wu *et al.* show that the temperature at which the hydrothermal process is carried out in the synthesis of ZnO nanoparticles (ZnONPs) is essential to obtain different nanostructures, for example, at 70°C, rod-shaped nanoparticles are obtained, while at 90°C prismatic nanostructures are obtained. Furthermore, experiments carried out by Aquino *et al.* [37] show that by performing the synthesis at 50°C, ZnONPs with a wurtzite-like structure are produced. In this work, the thermal energy that the hydrothermal process provides to terminal chemical reactions was provided by microwave radiation.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 summarizes the thermochemical values obtained for each of the chemical species involved in the complete reaction mechanism, under the HF 3-21G / CPCM quantum chemical level of theory. These values are necessary to calculate the enthalpy of reaction and Gibbs free energy of reaction of each semi-reaction involved, shown in Table 2.

From the values shown in Table 2, it is observed that the reactions of equations (1)-(3) and (8) are spontaneous and exothermic processes since the Gibbs free energy values of reaction and enthalpy of reaction are negative, while on the other hand, the reactions of equations (5) and (6) show a positive value in $\Delta_r G^\circ$ and $\Delta_r H^\circ$ indicating endothermic and not spontaneous reactions. These results are consistent with the synthesis process, since just in non-spontaneous endothermic reactions [Eq. (5) and (6)] correspond to the microwave radiation process, that is, it provides the necessary thermal energy to carry out the dissociation of the precipitated gel $\text{Zn}(\text{OH})_2$ to form the $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ complex. Then, the power configured in the microwave radiation equipment (Fig. 1) is crucial to form the ZnO Ps, if the energy supplied to the system is not enough, it will be obtained as the product $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Calculations of the band gap energy between the highest orbital molecular occupied (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO, E_g), and quantum molecular descriptors such as chemical potential (μ), global hardness (η) and the electrophilicity index (ω) were obtained to study the chemical reactivity and stability of the molecules involved [38]. The quantum molecular descriptors are determined from the values of the energies of the HOMO and LUMO, by means of the equations established in the Koopman's theorem [39]. Therefore, μ and η can be calculated with equations (10) and (11), respectively:

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} = -\frac{I + A}{2}, \quad (10)$$

$$\eta = \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{v(r)} = \frac{I - A}{2}, \quad (11)$$

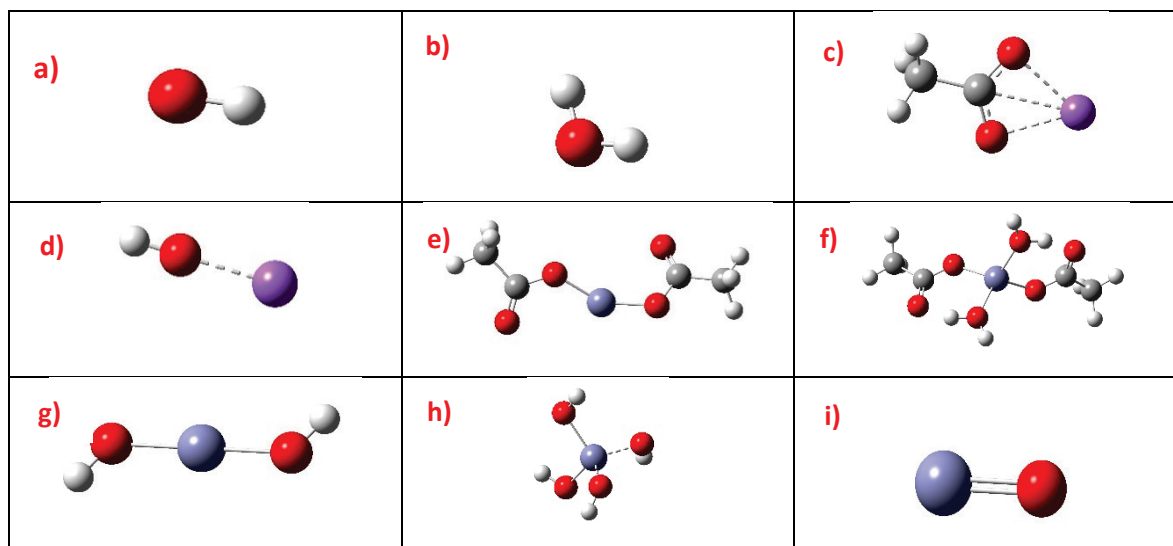


Figure 5. Optimized molecular structures: a) hydroxyl ion; b) water; c) sodium acetate; d) sodium hydroxide; e) zinc acetate; f) zinc acetate dihydrate; g) zinc hydroxide; h) zinc tetrahydroxide complex; i) molecular ZnO

where $I = -E_{HOMO}$ is the ionization potential, $A = -E_{LUMO}$, I/A is the electronic affinity, E is the total energy, N is the number of electrons and $v(r)$ is the external potential of the system [40]. The global electrophilicity index is described by Parr [41], employs the electronic chemical potential and is given by:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}.$$

This descriptor measures the tendency of chemical species to accept electrons. Small values of ω indicate that the chemical species behaves like an electron donor (nucleophile), while high values of ω characterize a chemical species that behaves as an electron acceptor (electrophile).

Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) has become the most widely-used theoretical approach to simulate the optical properties of both organic and inorganic molecules [42]. Since the final product (ZnO Ps) has important optical properties, the energy of the zinc oxide molecule with TD-DFT was calculated with the 3-21G basis set, replacing the Hartree-Fock / 3-21G calculations. Table 3 summarizes the values obtained from the quantum molecular descriptors, as well as the HOMO-LUMO gap, noting that for ZnO a value very close to the experimental one [43] is obtained.

The ZnO Ps obtained by microwave-assisted hydrothermal synthesis were characterized by SEM, finding that they possess a branched structure of micrometrical size (Fig. 7). Furthermore, X-ray diffraction (XRD) shows the crystalline phase of the microparticles (Fig. 8) with crystal size of 31.3 nm. The diffraction pattern corresponds to Wurtzite-type hexagonal ZnO with lattice parameters $a = b = 3.253$ and $c = 5.213$ Å.

Table 1. Thermochemical values calculated in (kJ/mol) for the reagents, intermediates and products in the synthesis of ZnO MPs

Chemical Compound	Electronic Energy (E_0)	$E_0 + H_{corr}$	$E_0 + G_{corr}$
$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	-6229100.196	-6228671.972	-6228831.069
$Zn(CH_3COO)_2$	-5831899.558	-5831609.952	-5831752.874
H_2O	-199610.3241	-199547.7112	-199603.7656
NaOH	-623048.2527	-623007.2792	-623074.2215
Na^+	-424867.9283	-424861.7321	-424905.8116
$(OH)^-$	-198280.7761	-198251.3206	-198302.6255
$Zn(OH)_2$	-5063750.81	-5063674.505	-5063761.572
$NaCOOCH_3$	-1015871.665	-1015727.325	-1015828.121
Zn^{2+}	-4666760.217	-4666754.021	-4666801.902
$Zn(OH)_4^{2-}$	-5433561.054	-5433418.011	-5433535.907
H^+	-424.2283223	-418.0321418	-450.4833243
ZnO	-4840262.137	-4840248.621	-4840315.219

Table 2. Enthalpy and Gibbs free energy (kJ/mol) of reaction for each half-reaction

Equation Number	(1)	(2)	(3)	(5)	(6)	(8)
$\Delta_r H^\circ$	-2033.402645	-211.5470531	-17293.09861	417.843106	28098.00862	-2880.961369
$\Delta_r G^\circ$	-2129.335797	-268.4311404	-17248.06603	354.418897	28177.8107	-2988.328575

Table 3. Quantum Molecular Descriptors of molecules (eV)

Descriptors	Zn(CH ₃ COO) ₂	NaOH	Zn(OH) ₂	Zn ²⁺	Zn(OH) ₄ ²⁻	ZnO
E_{TOTAL}	-60443.39505	-6457.44175	-52482.0923	-48367.5737	-56314.9063	-50217.5126
E_{HOMO}	-11.0929989	-9.13513876	-11.8072981	-22.0474918	9.9215482	-4.83628194
E_{LUMO}	2.5907973	-0.28191009	0.6944349	-2.92957922	26.08267	-1.32628359
$E_g (HOMO-LUMO)$	13.6837962	8.85322867	12.501733	19.1179126	16.1611218	3.50999835
$I = -E_{HOMO}$	11.0929989	9.13513876	11.8072981	22.0474918	-9.9215482	4.83628194
$A = -E_{LUMO}$	-2.5907973	0.28191009	-0.6944349	2.92957922	-26.08267	1.32628359
$\eta = (I - A)/2$	6.8418981	4.42661433	6.2508665	9.55895629	8.0805609	1.75499918
$\mu = -(I + A)/2$	-4.2511008	-4.70852443	-5.5564316	-12.4885355	18.0021091	-3.08128277
$\omega = \mu^2/2\eta$	1.320675765	2.50419402	2.46957219	8.15797847	20.0528117	2.70493104

CONCLUSIONS

In this work, ab initio calculations with Hartree-Fock methods and 3-21G basis set were implemented to study the reaction kinetics in the synthesis of ZnO microparticles by microwave-assisted hydrothermal method. The theoretical part shows the thermochemical parameters of the chemical reactions that are carried out, as well as the reactivity of the molecules involved in the entire synthesis process, confirming which chemical reactions are thermodynamically favorable.

On the other hand, the experimental part shows that the ZnO MPs have a branched morphology with nanometric crystal size and that the microwave-assisted hydrothermal method is an economical, easy to make and efficient method for obtaining ZnO microparticles. It implies that the results obtained so far, will serve as the basis for further detailed research on the nucleation and growth of ZnO microparticles with branched morphology.

Therefore, the following hypotheses can be formulated: the synthesis process of ZnO MPs with branched morphology have underlying processes concatenated in series at three different scales such as molecular, nanometric and micrometric. The reaction mechanism describes completely the molecular process with AB INITIO simulation, while that the micrometric growth process could be explained by model of crystal phase field that reveal the mechanism of tridimensional dendritic solidification [1]. The mesoscale process (nanometric) could be given by a reaction-diffusion system with the ability of unified the molecular and nanometric scales, that serve as base of the nucleation mechanism by means of an auto-ensemble or/and auto-organization processes.

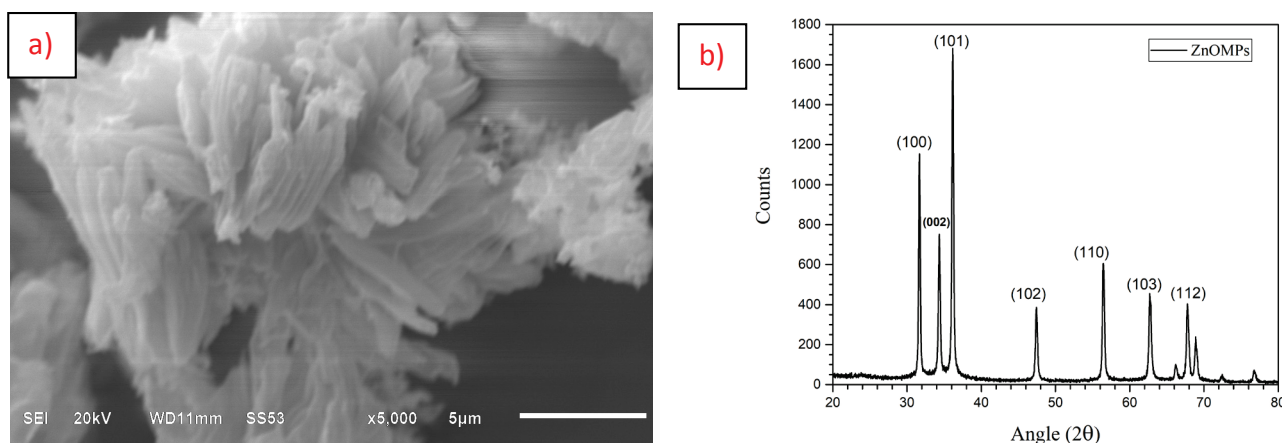


Figure 7. a) SEM micrograph of the morphology of ZnO microparticles and b) X-ray diffraction pattern of ZnOMPs synthesized by microwave-assisted hydrothermal method

References:

1. Morales M.A., Fernández-Cervantes I., Agustín-Serrano R., Ruíz-Salgado S., Sampedro M.P., Varela-Caselis J.L., Rubio E. Ag₃PO₄ microcrystals with complex polyhedral morphologies diversity obtained by microwave-hydrothermal synthesis for MB degradation under sunlight. *Results in Physics*, 2019, vol. 12, pp. 1344-1356. DOI: 10.1016/j.rinp.2018.12.082.
2. Wang J., Lee Y.-J., Hsu J.W.P. One-step synthesis of ZnO Nanocrystals in n-butanol with bandgap control: applications in hybrid and organic photovoltaic devices. *J Phys Chem C*, 2014, vol. 118, pp. 18417-18423.
3. Nair S., Sasidharan A., Divya Rani V.V., Menon D., Nair S., Manzoor K., Raina S. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2008, vol. 20 (S1), pp. 235-241. DOI: 10.1007/s10856-008-3548-5.
4. McCune M., Zhang W., Deng Y. High efficiency dyesensitized solar cells based on three-dimensional multilayered ZnO nanowire arrays with "caterpillar-like" structure. *Nano Lett*, 2012, vol. 12, pp. 3656-3662.
5. Rycenga M., Cobley C.M., Zeng J., Li W., Moran C.H., Zhang Q., Xia Y. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chemical Reviews*, 2011, vol. 111(6), pp. 3669-3712. DOI: 10.1021/cr100275d.
6. Sun Y. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science*, 2002, vol. 298 (5601), pp. 2176-2179. DOI: 10.1126/science.1077229.
7. Batvandi M., Haghighatzadeh A., Mazinani B. Synthesis of Ag₃PO₄ microstructures with morphology-dependent optical and photocatalytic behaviors. *Applied Physics A*, 2020, vol. 126 (7). DOI: 10.1007/s00339-020-03761-6.
8. Klingshirn C.F., Meyer B.K., Waag A., Axel H., Johannes M.M. Geurts Zinc Oxide: From Fundamental Properties Towards Novel Applications. *Springer*, 2010, pp. 9-10. ISBN 978-3-642-10576-0.
9. Baruah S., Dutta J., Dutta «Hydrothermal growth of ZnO nanostructures». *Sci. Technol. Adv. Mater.*, (free download) 2009, vol. 10, p. 013001. Bibcode: 2009STAdM...10a3001B. DOI: 10.1088/1468-6996/10/1/013001.
10. Özgür Ü., Alivov Ya.I., Liu C., Teke A., Reshchikov M.A., Doğan S., Avrutin V., Cho S.-J. et al. A comprehensive review of ZnO materials and devices. *Journal of Applied Physics*, 2005, vol. 98 (4), p. 041301. Bibcode: 2005JAP...98d1301O. DOI: 10.1063/1.1992666.
11. Hamdani F., Botchkarev A., Kim W., Morkoc H., Yeadow M., Gibson J.M., Tsen S.C.Y., Smith D.J., Evans K., Litton C.W., Michel W.C., Hemenger P. *Appl. Phys. Lett.*, 1997, vol. 70, p. 467.
12. Nomura K., Ohta H., Ueda K., Kamiya T., Hirano M., Hosono H. *Science*, 2003, vol. 300, p. 1269.
13. Huang M.H., Mao S., Feick H., Yan H., Wu Y., Kind H., Weber E., Russo R., Yang P. *Science*, 2001, vol. 292, p. 1897.
14. Lee C.T., Su Y.K., Wang H.M. *Thin Solid Films*, 1987, vol. 150, p. 283.
15. Silva R.F. Filmes de óxido de zinco dopado com alumínio ou európio: Preparação e caracterização. Tese (Doutorado), Faculdade de Filosofia. *Ciências e Letras de Ribeirão Preto*, 2001.
16. Abrarov S.M., Yuldashev Sh.U., Lee S.B., Kang T.W. Suppression of the green photoluminescence band in ZnO embedded into porous opal by spray pyrolysis. *Journal of Luminescence*, 2004, vol. 109, pp. 25-29.
17. Sousa V.C. et al. Combustion synthesized ZnO powders for varistor ceramics. *International Journal of Inorganic Materials*, 1999, vol. 1, pp. 235-241.
18. Wang J., Gao L. Hydrothermal synthesis and photoluminescence properties of ZnO nanowires. *Solid State Communications*, 2004, vol. 132, pp. 269-271.
19. Lima S.A.M., Sigoli F.A., Davolos M.R., Jafelicci Jr.M. Europium (III)-containing zinc oxide from Pechini method. *Journal of Alloys and Compounds*, 2002, vol. 344, pp. 280-284.
20. Sharma D., Sabela M.I., Kanchi S., Bisetty K., Skelton A.A., Honarparvar B. Green synthesis, characterization and electrochemical sensing of silymarin by ZnO nanoparticles: Experimental and DFT studies. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2018, vol. 808, pp. 160-172. DOI: 10.1016/j.jelechem.2017.11.039.
21. Sun J., Wang H.-T., He J., Tian Y. Ab initio investigations of optical properties of the high-pressure phases of ZnO. *Physical Review B*, 2005, vol. 71 (12). DOI: 10.1103/physrevb.71.125132.
22. Serrano J., Romero A.H., Manjón F.J., Lauck R., Cardona M., Rubio A. Pressure dependence of the lattice dynamics of ZnO: An ab initio approach. *Physical Review B*, 2004, vol. 69 (9). DOI: 10.1103/physrevb.69.094306.
23. Saib S., Bouarissa N. Structural parameters and transition pressures of ZnO: ab-initio calculations. *Physica Status Solidi (b)*, 2007, vol. 244 (3), pp. 1063-1069. DOI: 10.1002/pssb.200642441.
24. Binkley J.S., Pople J.A., Hehre W.J. "Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 21. Small Split-Valence Basis Sets for First-Row Elements". *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, vol. 102, pp. 939-47. DOI: 10.1021/ja00523a008.
25. Pietro W.J., Francel M.M., Hehre W.J., Defrees D.J., Pople J.A., Binkley J.S. "Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 24. Supplemented small split-valence basis-sets for 2nd-row elements". *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, vol. 104, pp. 5039-48. DOI: 10.1021/ja00383a007.
26. Frisch M.J. et al. *Gaussian 09, revision A.1*. Gaussian Inc., Wallingford, 2009.
27. Klamt A., Schuurmann G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1993, vol. 2, (5), pp. 799-805. DOI: 10.1039/p29930000799.

28. Barone V., Cossi M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *The Journal of Physical Chemistry A*, 1998, vol. 102 (11), pp. 1995-2001. DOI: 10.1021/jp9716997.
29. Liu T., Zhao L., Zhong R. DFT investigations of phosphotriesters hydrolysis in aqueous solution: a model for DNA single strand scission induced by N-nitrosoureas. *Journal of Molecular Modeling*, 2012, vol. 19 (2), pp. 647-659. DOI: 10.1007/s00894-012-1592-z.
30. Mikula H., Svatunek D., Skrinjar P., Horkel E., Hametner C., Fröhlich J. DFT study of the Lewis acid mediated synthesis of 3-acyltetramic acids. *Journal of Molecular Modeling*, 2014, vol. 20 (5). DOI: 10.1007/s00894-014-2181-0.
31. Ensuncho A.E., López J.M., Robles J. Estudio Computacional de la Cinética y Mecanismos de Reducción del Colorante Rojo Allura por Bisulfito de Sodio en Fase Acuosa. *Información Tecnológica*, 2013, vol. 24 (2), pp. 15-22. DOI: 10.4067/s0718-07642013000200003.
32. Bari A.R., Shinde M.D., Vinita D., Patil L.A. Effect of Solvents on the Particle Morphology of nanostructured ZnO. *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, 2009, vol. 47, pp. 24-27.
33. Yung K., Ming H., Yen C., Chao H. Synthesis of 1D, 2D and 3D ZnO Polycrystalline Nanostructures Using Sol-Gel Method. *Journal of Nanotechnology*, 2012, pp. 1-8.
34. Haase M., Weller H., Henglein A. "Photochemistry and Radiation Chemistry of Colloidal Semiconductors. 23. Electron Storage on ZnO Particles and Size Quantization". *The Journal of Physical Chemistry*, 1988, vol. 92, pp. 482-487.
35. Wu C., Qiao X., Chen J., Wang H., Tan F. A novel chemical route to prepare ZnO nanoparticles. *Mater Lett.*, 2006, vol. 60 (15), pp. 1828-1832.
36. Smith G.D., Bell R., Borodin O., Jaffe R.L. A Density Functional Theory Study of the Structure and Energetics of Zincate Complexes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2001, vol. 105 (26), pp. 6506-6512.
37. *Rev Soc Quím Perú*, 2018, vol. 84 (1).
38. Gázquez J.L. Perspectives on the density functional theory of chemical reactivity. *J. Mex. Chem. Soc.*, 2008, vol. 52, pp. 3-10.
39. Koopmans T. Über die zuordnung von wellenfunktionen und eigenwerten zu den einzelnen elektronen eines atoms. *Physica*, 1934, vol. 1, pp. 104-113. DOI: 10.1016/s0031-8914(34)90011-2.
40. Parr R.G., Donnelly R.A., Levy M., Palke W.E. Electronegativity: The density functional viewpoint. *J. Chem. Phys.*, 1978, vol. 68, pp. 3801-3807. DOI: 10.1063/1.436185.
41. Parr R.G., Szentpály L.V., Liu S. Electrophilicity index. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, pp. 1922-1924. DOI: 10.1021/ja983494x.
42. Laurent A.D., Jacquemin D. TD-DFT benchmarks: A review. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2013, vol. 113 (17), pp. 2019-2039. DOI: 10.1002/qua.24438.
43. Srikant V., Clarke D.R. On the optical band gap of zinc oxide. *Journal of Applied Physics*, 1998, vol. 83 (10), pp. 5447-5451. DOI: 10.1063/1.367375.

MODELING AND COMPUTATIONAL SIMULATION OF PHOTOCATALYSIS OF A BISMUTH OXYALURER FOR AIR REMEDIATION

Solares E., Morales M.A., Luna-Flores A., Cervantes-Tavera A.M., Hernández-Santiago A.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

Puebla, Mexico

Received: 20.07.2020

Introduction.

Bismuth-based materials have been extensively studied due to their possible applications in various areas, especially used as promising photocatalysts for the removal of persistent organic pollutants (COP). Advanced oxidation processes that employ highly oxidizing hydroxyl radicals serve for development in wastewater decontamination processes, in air purification, and in the production of clean energy through the separation of water into H₂ and O₂. Furthermore, among the various advanced oxidation processes, heterogeneous photocatalysis is the most promising approach that has been significantly investigated in the last two decades due to its potential to completely remove organic compounds. Mechanism of photocatalysis using semiconductors is documented in the literature and a great deal of research has been carried out on the design and development of various photocatalysts. For instance, bismuth oxyhalides (BiO_x, X = F, Cl, Br, I) are a new class of two-dimensional materials that have attracted extensive interest owing to their tetragonal PbFCl⁻ type layered crystal structure with [Bi₂O₂]²⁺ slabs interleaved by double slabs of halogen ions that produces an internal static electric field perpendicular to each layer [1-3]. The self-generated internal electric field produced in bismuth oxyhalides is favorable for the transport of electrons and photoinduced holes within the crystal, resulting in increased photocatalytic activity due to the greater separation of photogenerated charge carriers. There are various bismuth oxyhalides, such as BiOBr, which have attracted great attention due to its high stability, good electrical conductivity and relatively superior photocatalytic activity under visible light.

On the other hand, the formation of spatio-temporal patterns has been analyzed using various types of mathematical models from nonlinear chemistry [8]. From the biological point of view, the patterns formed by the numerical solutions of these models can be classified into two categories: chemical patterns and patterns of cell movement. In the category of chemical standards there are two types of models: gradient models and reaction-diffusion models [5, 6]. Reaction-diffusion models describe the chemical interactions that generate complex patterns in space and / or time, due to the presence of transport, synthesis and degradation terms that depend on all the chemical substances present in the analysis domain. Moreover, cell movement models analyze the formation of spatial patterns due to changes in cell density, by aggregation or repulsion between cells, or by response to specific chemical substances. In 1952 A. Turing was the first to observe and attribute to chemical interactions between substances the self-formation of patterns in nature [9] and studied the solutions of biological models described by reaction-diffusion equations. In them he found that there can be three types of instabilities: a) oscillatory in time and uniform in space, related to Hopf instabilities independent of space [4], b) stationary in time and periodic in space [5, 9], and c) oscillatory in space and time [8, 7]. Turing further demonstrated that a chemical reaction-diffusion system can evolve into heterogeneous spatial patterns from a uniform steady state in response to small perturbations. Accordingly, he established that diffusion can lead to chemical instability, thus inducing the formation of a spatial pattern where it did not previously exist. This type of instability, stationary in time, is better known as Turing instability.

In this research work, a reaction mechanism for ox-redox kinetics is proposed by interacting a hypothetical semiconductor with electromagnetic radiation in the ultraviolet. Subsequently, using the reaction mechanism obtained from nonlinear chemistry, a diffusion reaction system is deduced that presents Turing and Turing-Bogdanov-Takens instability. Using the numerical method of functional difference implemented in python and its libraries [10], a three-dimensional (3D) computational simulation is obtained from the numerical solution of the spatio-temporal kinetic of ox-redox carry out during the air remediation.

1. Mathematical reaction-diffusion model for photocatalysis of bismute oxyhalides in air remediation.

Photocatalysis process to the elimination of NO_x-type gases and its photo-oxidation mechanism can be carried out through the reaction of the polluting gases with the hydroxyl and superoxide radicals generated during the activation of the semiconductor (SC), according to the series of chemical reactions represented by the sequence of basic reactions may be written as:



Performing the corresponding operations, from equations (1)-(3) and (7). Subsequently taking equations (4)-(6) two final equations are obtained



Applying the law of mass action, we obtain:

$$V_1 = k_1[OH^*]^3[NO] \quad (10)$$

$$V_3 = k_2[NO][OH^-][O_2] \quad (11)$$

Assigning variables to interest and constants terms that can remain constant during the catalysis, substituting in the equations

$$x = NO, y = NO_3^-, z = OH^*, A = O_2.$$

Substituting the variables assigned to the proposed equations based on equations (10) and (11), if a compound is reactive, it will be subtracted in the equation, since it is consumed during the catalysis process, but if it is a product, it will be positive because it is generated in the reaction:

$$\frac{d[x]}{dt} = -k_1[z]^3[x] - k_2[x][OH^-][A] \quad (12)$$

$$\frac{d[y]}{dt} = k_1[z]^3[x] + k_2[x][OH^-][A] \quad (13)$$

$$\frac{d[z]}{dt} = -k_1[z]^3[x] + k_2[x][OH^-][A] \quad (14)$$

The hydroxyl radical (OH *) is an intermediate in the reaction for the formation of NO_x compounds, therefore, this change tends to 0:

$$\frac{d[z]}{dt} = 0, \\ 0 = -k_1[z]^3[x] + k_2[x][OH^-][A].$$

Solving [z]³ from equation (14) we will obtain:

$$[z]^3 = \frac{k_2[x][OH^-][A]}{k_1[x]} \quad (15)$$

Substituting equation (15) into equations (12) and (13):

$$\frac{d[x]}{dt} = -2k_2[x][OH^-][A] \quad (16)$$

$$\frac{d[y]}{dt} = 2k_2[x][OH^-][A] \quad (17)$$

The analysis is simplified by converting these equations to a dimensionless form. The appropriate conversion factors are:

$$\frac{[x]k_1}{k_2[A]} = [X] \text{ donde } k_1 = \frac{L^3}{s * mol^{-3}}, k_2 = \frac{L^2}{s * mol^{-2}}$$

Hydroxyl potential can be measured, so we establish a relationship by giving it a variable "L"

$$-\log_{10}[OH^-] = pOH \\ [OH^-] = 10^{-pOH} = L$$

Introducing dimensionless parameters, we obtain a simpler form of the equations into (16) and (17):

$$\frac{d[X]}{dt} = -2xL, \quad (18)$$

$$\frac{d[Y]}{dt} = 2xL. \quad (19)$$

In order to perform a computational simulation, it is necessary to find the domain of the numerical solution of a system of nonlinear partial differential equations (NPDE). Applying the diffusivity term to the system of equations:

$$\frac{d[x]}{dt} = D_x \nabla^2 [x] - 2x[L], \quad (20)$$

$$\frac{d[y]}{dt} = D_y \nabla^2 [y] + 2x[L]. \quad (21)$$

This type of NPDE system is called a reaction-diffusion system (RDS). Thus, it is necessary to find this domain using a general analysis technique called *Linear Stability Analysis*. This technique of studying mathematical models to solve NPDE by making $\nabla^2 = 0$ using the finite difference numerical method.

$$F = -2x[L], \quad (22)$$

$$G = 2x[L]. \quad (23)$$

We must compute the fixed points defined as the roots of the nonlinear terms of an EDPN system by making $\frac{\partial[u]}{\partial x} = 0, \frac{\partial[u]}{\partial y} = 0, \frac{\partial[v]}{\partial x^2} = 0, \frac{\partial[v]}{\partial y^2} = 0, \dots$, etc. Therefore, when substituting these conditions in the RDS we obtain: $F(u(x, y, t), v(x, y, t), t) = 0, G(u(x, y, t), v(x, y, t), t) = 0$. This new system must be solved by some method to calculate the roots (u_0, v_0), either to obtain the solutions exactly (u_0, v_0)

$$\frac{\partial[F]}{\partial x} = -2[L], \frac{\partial[F]}{\partial y} = 0, \frac{\partial[G]}{\partial x} = 2[L], \frac{\partial[G]}{\partial y} = 0 \quad (24)$$

Jacobian:

$$J(u, v) = \begin{pmatrix} \frac{\partial[F]}{\partial x} & \frac{\partial[F]}{\partial y} \\ \frac{\partial[G]}{\partial x} & \frac{\partial[G]}{\partial y} \end{pmatrix} \quad (25)$$

$$\text{Tr}[J(u, v)] = \frac{\partial[F]}{\partial x} + \frac{\partial[G]}{\partial y} = -2[L] \quad (26)$$

Determinant without the term of diffusion:

$$0 = \left| \lambda \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} \frac{\partial[F]}{\partial x} & \frac{\partial[F]}{\partial y} \\ \frac{\partial[G]}{\partial x} & \frac{\partial[G]}{\partial y} \end{pmatrix} \right| \quad (27)$$

Determinant with the term of diffusion:

$$0 = \left| \lambda \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} -2[L] & 0 \\ 2[L] & 0 \end{pmatrix} - k^2 \begin{pmatrix} D_x & 0 \\ 0 & D_y \end{pmatrix} \right| \quad (28)$$

Solving:

$$\lambda^2 + \lambda\gamma + \omega = 0 \quad (29)$$

Where

$$\gamma = 2L + k^2(D_x + D_y) \quad \omega = 2Lk^2D_y + k^4D_xD_y$$

Deriving ω according to k^4 and obtain k^2 :

$$\omega' = 2LD_y + 2k^2D_xD_y \quad (30)$$

$$k^2 = -\frac{L}{D_x} \quad (31)$$

and defining:

$$D = \frac{D_y}{D_x} \quad (32)$$

Can be wrote γ as:

$$\gamma = L(1 - D), \quad \omega = -2L^2D. \quad (33)$$

Calculation of instabilities: the steady states of the RDS are those points where it reaches equilibrium and there is no dynamics ($\partial u / \partial t = 0, \partial v / \partial t = 0$), that is, at the fixed points (u_0, v_0). On the other hand, an unsteady state is where there is dynamics and the value of the eigenvalues determines the form of the RDS solutions and therefore the unsteady states:

$$\lambda_{\pm} = \frac{1}{2}(\gamma) \pm \sqrt{(\gamma)^2 - 4(1)(\omega)}. \quad (34)$$

2. Results analysis of linear stability and its computational simulation.

2.1. Spatio-temporal instabilities.

To find the Turing instability (s) of our reaction system, which we will call the OH-NO_x reaction model, we used the Gnuplot 5.2 graph, the parameters taken were "L" and "D", where L represents the concentration of hydroxyl radicals and D represents the concentration of nitrated compounds (NO_x), the range of values taken for L and D were 0 to 1 in both cases.

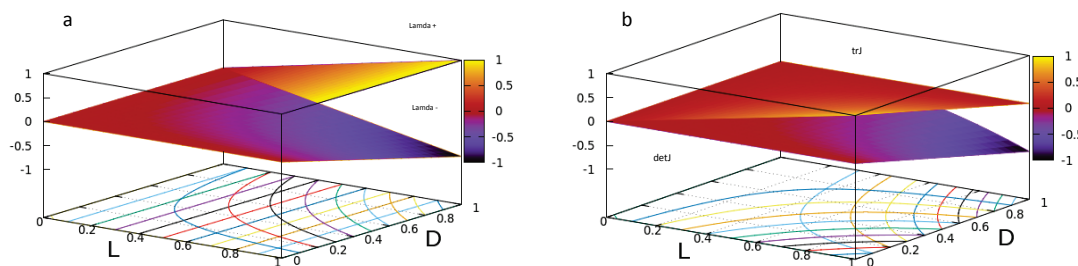


Figure 1. Turing instability graph (a) view of positive lamda (upper plane orange-yellow color) and negative lamda (violet color) lower plane, (b) view of the trJ and detJ, corresponding to a saddle point

Table 1. Parameters used for 3D simulations in Python

pOH	pH	D	L	Figure 2
2	12	0.5	1×10^{-2}	C)
7	7	0.15	1×10^{-7}	B)
11	3	0.9	1×10^{-11}	A)

Figure 2, according to the mathematical analysis of Turing instability that predicts the type and shape of the emerging patterns of the temporal solution of the reaction-diffusion equations for our system. The curvature of the contour lines in Figure 1 (a and b) colored lines that are shown along the planes at the bottom of both positive and negative images, as well as trA (trace) and detJ (determinant) that clearly denotes the type of instability called saddle point according to literature. This means that this state of stability is always unstable far from zero for the OH-NO_x reaction model. In addition to it, is found a Turing-Bogdanob-Takens instability for $L \ll 1$ (see Fig. 1), it is: $1 \times 10^{-2} > L$.

2.2. 3D Computer Simulation.

Python 2.7.6 64-bit and Mayabi2 [11] were used to carry out the 3D modeling, runs were made for $L = 1 \times 10^{-8}$ and $D = 0.5$ with the following parameters, grid size $128 \times 128 \times 128$, mesh size between node and node $dx = \pi / 4$, time step $dt = 0.01$, $Da = 5$ and $n = 100,000$ iterations and dimensionless time $t = n \, dt = 1000$.

The reaction-diffusion system was solved according to the parameters in the following table 1.

From table 1 the simulations were for three different pOH, each with different diffusion ratio factors D. Figure 3 (a) shows the behavior in the acid medium of the production of hydroxyl (left) and nitrated compounds (center) for the time 100 to 10,000 iterations which is the same as it is 50% for both, the diffusion can be observed in the red-orange zones themselves which are the regions of greatest concentration, the 3D simulation of the mixture (right) presents zones of high intensity in which the diffusion of both compounds distributed at random is carried out, the areas of king blue represent less diffusion.

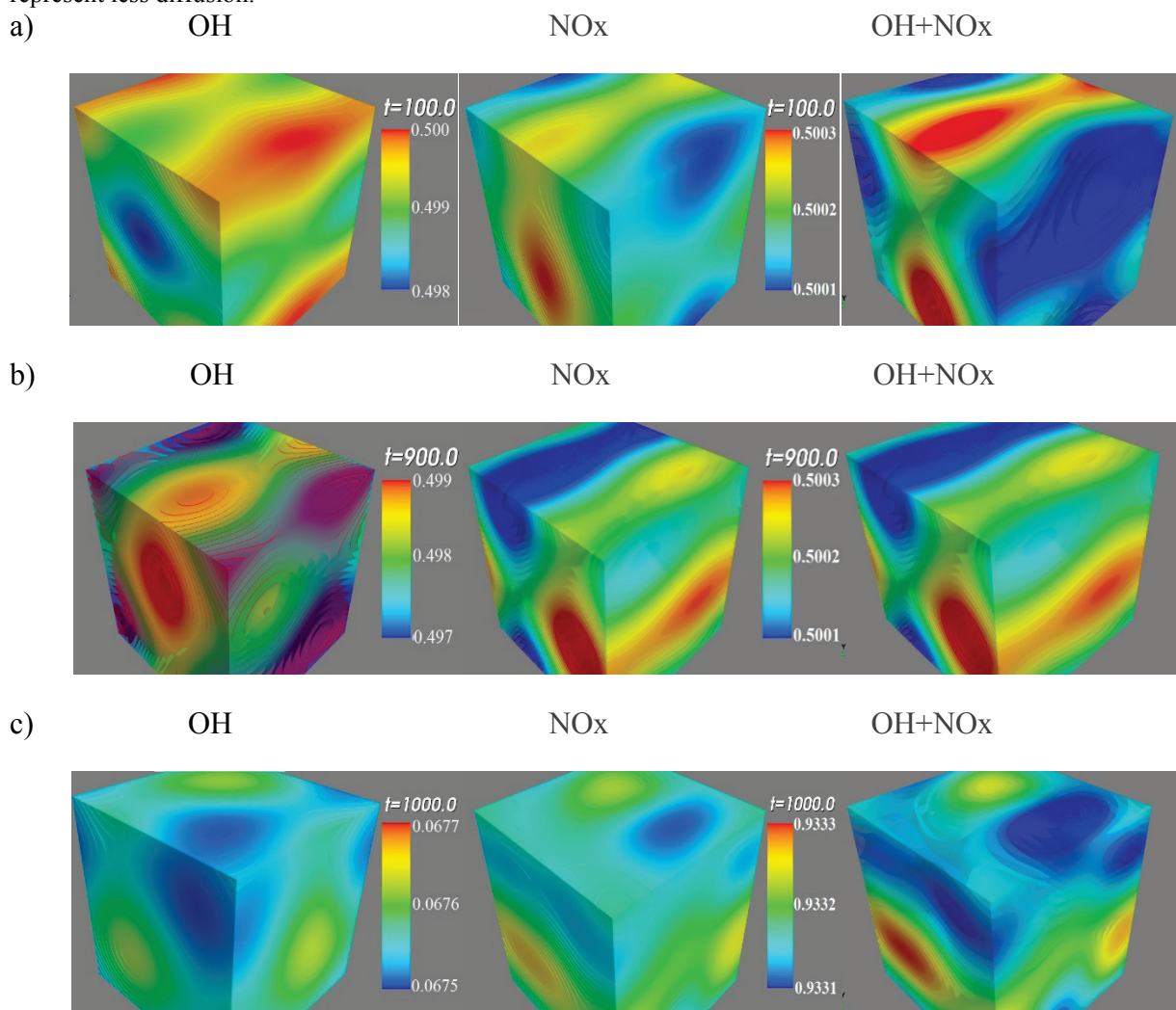


Figure 2. 3D simulations obtained by Python for hydroxyl radicals (left column), nitrated compounds (center columns) and mixture of both compounds (right column) for (a) time 100, (b) time 900, (c) time 1000. See Table 1 for known the values of control parameters D and L

By iterations recurring, it shows that the spatio-temporal diffusion dynamics of the production of nitrated NO_x compounds and hydroxyl radicals under the influence of the photocatalyst of bismuth oxyhalides, is carried out in a controlled manner, the production is 50% just like an acid medium. 3D simulations show significant activity in the formation of hydroxyl (bottom left, left image) and nitrated NO_x compounds (bottom left, central image), the diffusion in the mixture is concentrated in the same area as in the two previous images.

Finally, simulations were obtained for the basic medium at pOH 2 (pH 11), Figure 3 (c) represented for the dimensional time 1000 units (or 100,000 iterations), we can note that the diffusion and production process of both compounds is faster, we shows that the efficiency in a basic medium of nitrated compounds (NO_x) (central image) effective, since, the production is 93% and only 6% of hydroxyl after the reaction is finished, the evolution over time describe an accelerated diffusion process for the formation of radicals and nitrated compounds.

Conclusion.

The mathematical model proposed for the description of reaction-diffusion due to Bismuth oxyhalide photocatalysts demonstrate that they are useful to exemplify the formation process of the compounds of interest. It can be seen how the hydroxyl potential (pOH) influences the reaction speed of the OH- NO_x reaction model, since it can be seen how the diffusion is carried out with greater speed for more basic potentials and a slower behavior for high potentials. Conversely, the reaction rate is carried out for basic pH and is slower for acids, given the inverse relationship between pH and pOH. Furthermore, the existence of spatial instabilities such as diffusion-induced instability (Turing instability) and a type of critical instability (Turing-Bogdanov-Takens) due to small perturbations of the uniform steady state, and the relationship between these instabilities are shown, showing that Turing space is the number space where the parameters of a model meet the given formations and the formation of spatio-temporal patterns is possible.

References:

1. Montoya Maria. *Síntesis de oxihaluros de bismuto BiOX ($x = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) para su aplicación como fotocatalizadores en la purificación de aire por eliminación de gases tipo NO_x* . Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2017.
2. Shenoy Sridharan. *Bismuth oxybromide nanoplates embedded on activated charcoal as effective visible light driven photocatalyst*. 2020. DOI: 10.1016/j.cplett.2020.137435.
3. Bac1ha A.U.R., Nabi I., Fu Zh., Li K., Cheng H. *A comparative study of bismuth-based photocatalysts with titanium dioxide for perfluorooctanoic acid degradation*, 2019. DOI: 10.1016/j.cclet.2019.07.058.
4. Pouya Bastani. *Pattern Formation in the Gray-Scott Model*. Department of. Mathematics – Simon Fraser University, 2012.
5. Vanegas, Landinez, Garzón. Analysis of Turing instability in biological Models. *Dynamics, Universidad Nacional de Colombia*, 2018, vol. 76, no. 158, pp. 123-134.
6. Kishore Dutta. *Reaction-diffusion Dynamics and Biological Pattern Formation*. Department of Physics, Handique Girls' College, Guwahati, India, 2017.
7. Mazin W., Rasmussen K.E., Mosekilde E., Borckmans P., Dewel G. *Pattern formation in the bistable Gray-Scott model*. Physics Department, The Technical University of Denmark, DK- 2800 Lyngby, Denmark, Service de Chimie-Physique, Université Libre de Bruxelles, 1050 Brussels, Belgium, 1996.
8. Sagués F., Epstein I.R. Nonlinear chemical dynamics. *Dalton transactions*, 2003, no. 7, pp. 1201-1217.
9. Turing A.M. The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of mathematical biology*, 1990, vol. 52 (1-2), pp. 153-197.
10. Landau R.H., Pi M.J., Bordeianu C.C. *Computational physics: Problem solving with Python*. John Wiley & Sons, 2015.
11. Ramachandran P., Varoquaux G. Mayavi: 3D visualization of scientific data. *Computing in Science & Engineering*, 2011, vol. 13 (2), pp. 40-51.

MULTILAYER PERCEPTRON NEURAL NETWORK FOR THE PREDICTION OF THE RIPENING STAGES OF FRUITS AND VEGETABLES

Hernández-Aguirre J.A., Arzola-Flores J.A., Vidal-Robles E., Saviñon-Flores M.F.,
Maldonado-García A., Guarneros-Bejarano G., Rojas-Rodríguez J.F.,
Hernández Santiago A.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla
Puebla, C.P. 71590, Mexico; e-mail: ximikad09@mail.ru

Received: 20.07.2020

Abstract. We propose the implementation of Machine Learning techniques for the classification of fruits and their ripening days using photographs of them. As a supervised learning method, a multilayer perceptron neural network was used. The results obtained from the neural network were compared with the K-nearest neighbors method through a Bayesian t-test, finding that the neural network is a better classifier of the type of fruit. Finally, Hierarchical Clustering was used to determine the ripening days of the fruits. The results obtained show that it is possible to generalize the neural network to improve its precision by increasing the variety of fruits and the size of the database.

Key words: neural network, ripening stages, prediction.

INTRODUCTION

Currently, due to the food demands of society and environmental problems, the supply of food to places increasingly distant from the place of production has become increasingly important [1,2], so producers have been in need to implement technological tools to guarantee the correct distribution of products [3], that is to say, they have had to achieve essential improvements in their logistics processes to ensure that their products arrive quickly at their destination and with the quality expected by the consumer. To guarantee the quality of their products, producers have currently implemented sensing mechanisms that allow products to be monitored during transport, and they have used sensors for temperature, humidity, color, the concentration of gases, etc., however, in most of the Sometimes, they are usually expensive and therefore inaccessible to producers [3, 4]. Thanks to the development of Artificial Intelligence (AI), it has been possible to equip computers with a learning capacity through the acquisition of experience; that is, it is possible to include computational algorithms from a series of data to endow them with the ability to recognize patterns [5]. Within the AI, there is a branch of Machine Learning, which is divided into supervised learning and unsupervised learning time [6, 7]. The first is to give it a series of data with its characteristics and label. In such a way, the algorithm through different evaluation techniques learns patterns so that later, it can be used to predict the label, only knowing the characteristics of the base of data. Supervised learning, in turn, is divided into classification and regression [7]. The classification is used when the variable to be predicted is categorical, while the regression is used when the variable to be predicted is numerical [6, 7]. On the other hand, unsupervised learning, as its name says, does not require knowing the label of the characteristics of the database, so it is used to determine if the data has some pattern of behavior or to perform a reduction in dimensions of the database [7]. At this point, it is possible to distinguish the immense possibility of solutions that the AI gives us for the problem of determining the quality of food products during transport, so it is possible to use a supervised learning algorithm to classify the different stages of ripening and quality of fruits and vegetables, for example using the data obtained through a humidity, color sensor, etc., or only through a photograph, so in this work, the implementation of a multilayer perceptron neural network is proposed [8] and combined with the convolutional neural network (CNN) SqueezeNet [9, 10] to classify first, between two types of fruits, apples and bananas and later, to carry out the classification of the stage of maturation in days using only photographs.

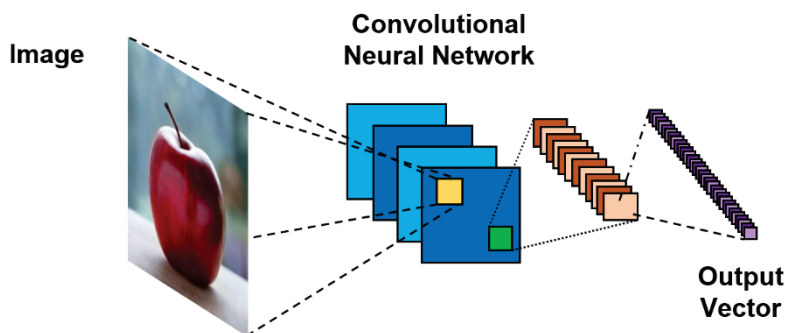


Figure 1. Schematic representation of embedded images on CNN SqueezeNet. A vector of dimension 1000 is obtained from each image

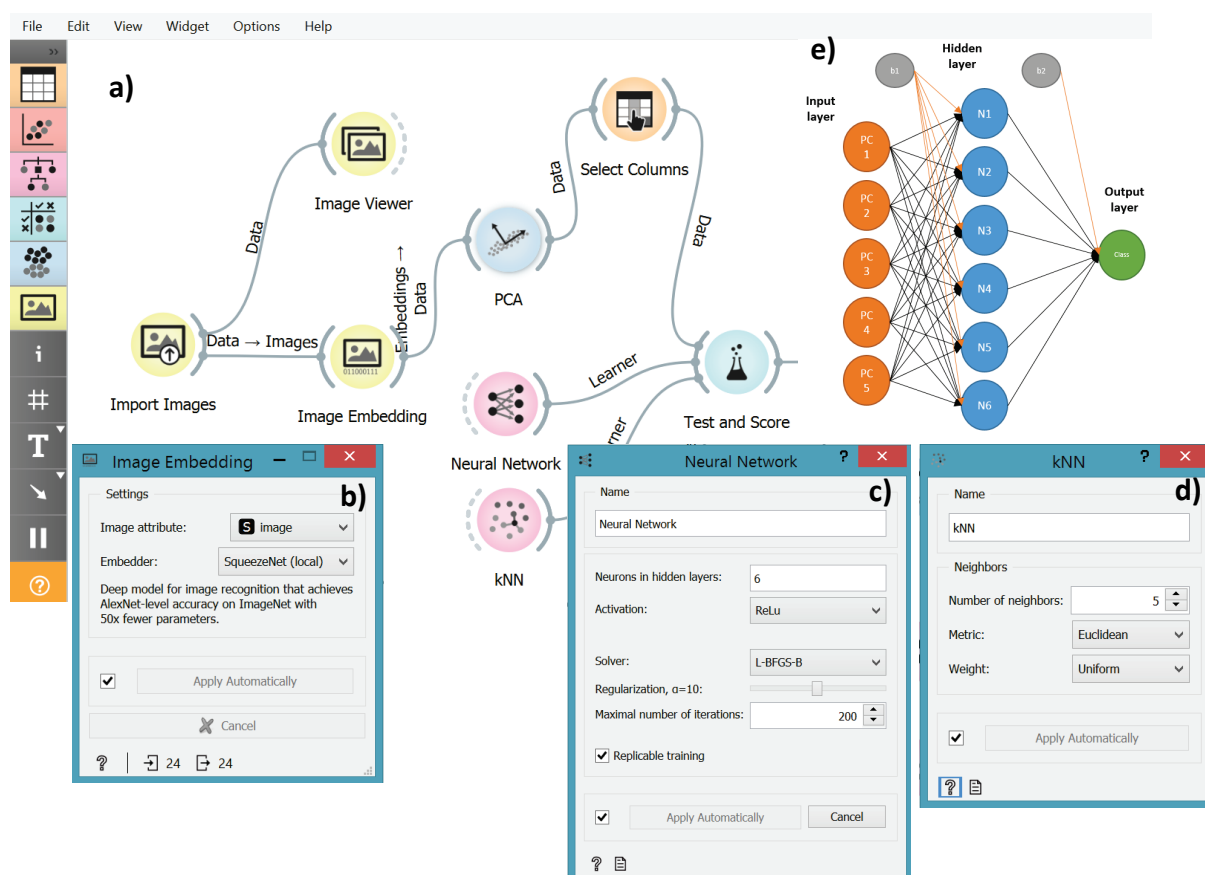


Figure 2. Orange interface for image processing, a) typical orange workflow, which is a visual toolbox with widgets that allows you to perform a large number of calculations, b) window that shows the “Image embedding” widget, in which the CNN SqueezeNet to embed the images, c) a window that shows the “Neural Network” widget for tuning the hyperparameters of the MLP, d) a window that shows the kNN widget for tuning hyperparameters of the k-Nearest Neighbors supervised learning model, and lastly e) architecture of MLP

METHODOLOGY

To carry out this study, photographs of bananas and apples at different ripening stages were obtained using a standard cell phone camera (Samsung Galaxy J6, 13 MP camera, LED flash, $f/19$). Once the images were obtained, the images were embedded using the transfer learning technique, which is an AI technique used to classify the images [10, 11]. Transfer learning consists of pre-training CNN with a large number of images to provide you with a certain degree of learning or experience. Later, this learning can be used to classify images of another very different problem. CNN SqueezeNet has been pre-trained with the ImageNet database [9, 10]. This CNN is used as an extractor of characteristics or descriptors (vectorize the images), obtaining a vector of dimension 1000 for each image (Fig. 1). Once the descriptors were obtained, a principal component analysis (PCA) was applied to extract the five principal components (PC), which explain 90% of the total variance (Fig. 2) [12]. Subsequently, the PC were used to train an MLP, which consisted of 1 hidden layer, with six neurons, with rectified linear activation function, Ridge penalty or regularization ($L2 = 10$), a constant learning rate ($\eta = 0.001$), a numerical tolerance of $1E-04$, a maximum number of iterations of 500 and L-BFGS [7, 8] was used as the optimizer of the MLP weights. Finally, as a training, validation, and testing method, stratified 10-fold cross-validation was used (Fig. 2). The confusion matrix of the MLP classifier was obtained in order to obtain the Classification accuracy (CA), F1-score (F1), Precision and Recall metrics [7, 8]. The results obtained from the MLP were compared with the K-nearest-neighbors (KNN) algorithm with five nearest neighbors, Euclidean metric and uniform weight through a Bayesian t-test [13]. The Orange Data Mining software was used for the analysis presented in this work (<https://orange.biolab.si/>) [10, 14].

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 3 shows the results obtained from the classification of the type of fruit using MLP and KNN as supervised learning methods. In Figure 3a) see the classification metrics for MLP and KNN, appreciate higher classification precision for all metrics in MLP method (CA = 0.833, F1 = 0.829, Precision = 0.875 and Recall = 0.833) compared to KNN method (CA = 0.792, F1 = 0.782, Precision = 0.853 and Recall = 0.792), which can be clearly seen in Figure 3b) where the MLP confusion matrix is shown, that is, the 12 images of the apples have been correctly classified, while 4 images of bananas

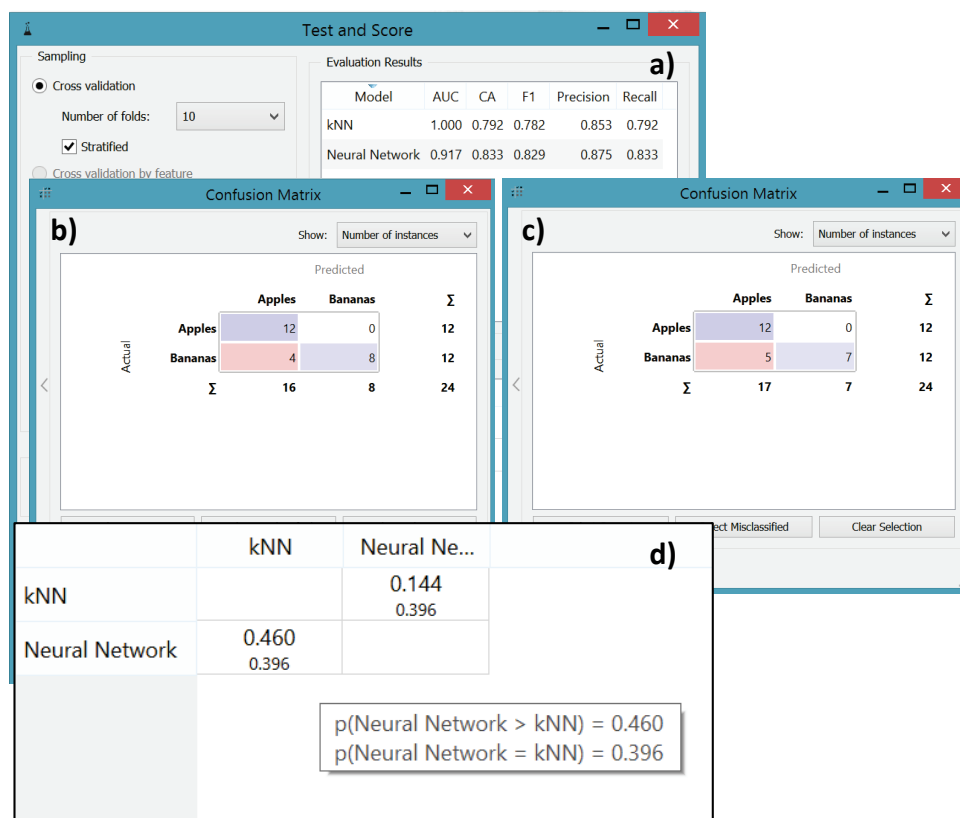


Figure 3. Results obtained from Orange, a) window that shows the widget "Test and Score," in it you can distinguish the evaluation technique (stratified 10-fold cross-validation) and the classification metrics, b) confusion matrix of the MLP method, in which it is identified that four images of bananas have been incorrectly classified as images of apples, c) KNN method confusion matrix, where it can be seen that five images of bananas have been incorrectly classified as images of apples, and lastly d) Bayesian t-test that shows that the MLP method is indeed a better classifier than the KNN method for the problem raised in this work

have been incorrectly classified as images of apples. On the other hand, Figure 3c) shows the confusion matrix of the KNN method, which shows that 12 images of apples have been classified correctly, while five images of bananas have been incorrectly classified as apples; therefore, the classification metrics of the KNN method are lower than those of the MLP method. However, to test if those differences are significant, a Bayesian test procedure [12] is performed, the results of which are considered in Figure 3d). This figure shows the probability that the method in the rows is a better classifier than the method in the columns; the small numbers inside the boxes show the probability that the difference is negligible. As can be seen $p(\text{Neural network} > \text{KNN}) = 0.460$, compared to $p(\text{KNN} > \text{Neural network}) = 0.144$ and $p(\text{Neural network} = \text{KNN}) = 0.396$, so the MLP method is a better classifier (for the problem posed in this work) than the KNN method. However, the MLP method classification metrics are still less than 0.9, so it is necessary to generalize the model, increasing the size of the database and test it with different evaluation techniques.

On the other hand, Figure 4a) shows the implementation of unsupervised learning to determine the existence of any pattern on the days of ripening from the images of the bananas. In Figure 4b), the "Distances" widget is shown, which calculates the distance between rows in the database (in this case formed by the 5 PC extracted after embedding the images with CNN SqueezeNet), to apply a Hierarchical Clustering to determine if possible clusters or groups [15]. As shown in Figure 4c), the resulting dendrogram is seen, observing four groups, which correspond to the days of maturation. With the above, it is possible to distinguish the days of ripening using only photographs of the fruits.

CONCLUSIONS

From the models compared in this work, we can conclude that the MLP is a better classifier than the KNN method, so it is possible to generalize the MLP method by increasing the variety of fruits and vegetables and incrementing the number of photographs. We can conclude that unsupervised learning, precisely the Hierarchical Clustering method, can determine the stages of fruit ripening using only photographs.

With the results obtained in this work, it is clear that it is possible to implement Machine Learning tools to classify between different types of fruits and their ripening stages, which may allow creating a mobile application that processes the photographs of the fruits in real-time, thereby decreasing the cost of food shipping losses.

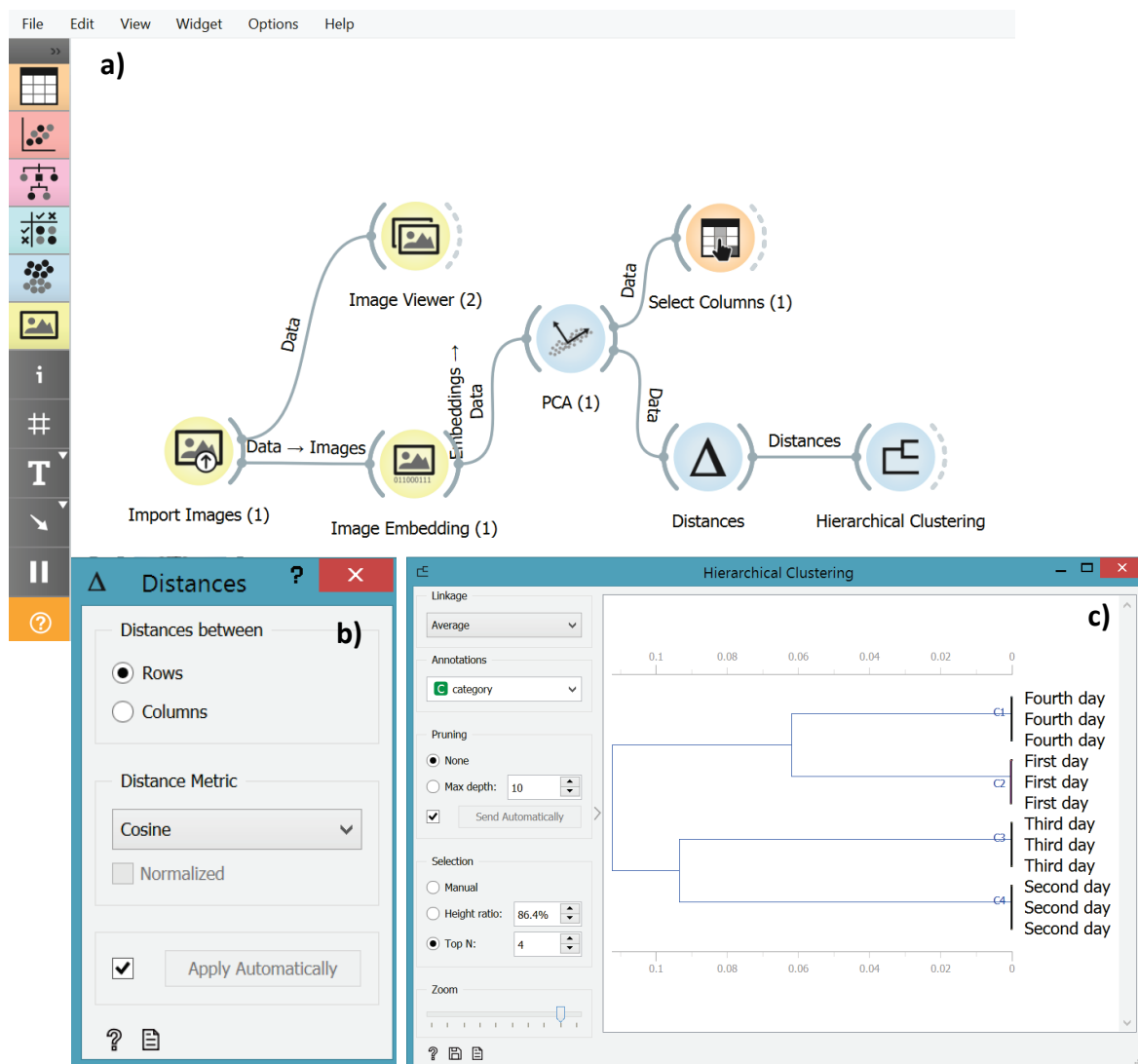


Figure 4. Results obtained from applying unsupervised learning to determine the ripening stage in days of bananas, a) workflow of the unsupervised learning method. The images are embedded with CNN SqueezeNet, which outputs a vector of dimension 1000 for each image. Vectorized the images, we proceed to extract the five PC, which explains 90% of the total variance. Obtained the PC, we continue to get the matrix of distances between rows of the PC to apply the Hierarchical Clustering subsequently and obtain the dendrogram, b) window that shows the "Distances" widget and finally, c) widget window "Hierarchical Clustering" which shows the dendrogram as a result

References:

1. Molina-Besch K., Wikström F., Williams H. The environmental impact of packaging in food supply chains-does life cycle assessment of food provide the full picture? *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 2019, vol. 24 (1), pp. 37-50. DOI: 10.1007/s11367-018-1500-6.
2. Soares P., Almendra-Pegueros R., Benítez-Brito N., Fernández-Villa T., Lozano-Lorca M., Valera-Gran D., Navarrete-Muñoz E.M. Sistemas alimentarios sostenibles para una alimentación saludable. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 2020.
3. Halonen N.J., Palvölgyi P.S., Bassani A., Fiorentini C., Nair R., Spigno G., Kordas K. Bio-based smart materials for food packaging and sensors—a review. *Frontiers in Materials*, 2020, vol. 7, p. 82. DOI: 10.3389/fmats.2020.00082.
4. Bouzembrak Y., Klüche M., Gavai A., Marvin H.J. Internet of Things in food safety: Literature review and a bibliometric analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, vol. 94, pp. 54-64. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.11.002.
5. Camaréna S. Artificial Intelligence in the design of transition to Sustainable Food Systems. *Journal of Cleaner Production*, 2020, p. 122574. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.122574.
6. Smola A., Vishwanathan S.V.N. *Introduction to machine learning*. Cambridge University, UK, 2008, vol. 32 (34).
7. Müller A.C., Guido S. *Introduction to machine learning with Python: a guide for data scientists*. O'Reilly Media, Inc., 2016.
8. Berzal F. *Redes neuronales & deep learning: vol. 2*. Independently published, 2019.
9. Iandola F.N., Han S., Moskewicz M.W., Ashraf K., Dally W.J., Keutzer K. SqueezeNet: AlexNet-level accuracy with 50x fewer parameters and < 0.5 MB model size. 2016. arXiv preprint arXiv:1602.07360.

10. Godec P., Pančur M., Ilenič N., Čopar A., Stražar M., Erjavec A., Žagar L. Democratized image analytics by visual programming through integration of deep models and small-scale machine learning. *Nature communications*, 2019, vol. 10 (1), pp. 1-7. DOI: 10.1038/s41467-019-12397-x.
11. Tan C., Sun F., Kong T., Zhang W., Yang C., Liu C. A survey on deep transfer learning. In International conference on artificial neural networks. *Springer, Cham.*, 2018, pp. 270-279.
12. Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A. Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2016, vol. 374 (2065), p. 20150202. DOI: 10.1098/rsta.2015.0202.
13. Corani G., Benavoli A. A Bayesian approach for comparing cross-validated algorithms on multiple data sets. *Machine Learning*, 2015, vol. 100 (2-3), pp. 285-304.
14. Demsar J., Curk T., Erjavec A., Gorup C., Hocevar T., Milutinovic M., Mozina M., Polajnar M., Toplak M., Staric A., Stajdohar M., Umek L., Zagar L., Zbontar J., Zitnik M., Zupan B. Orange: Data Mining Toolbox in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 2013, pp. 2349-2353. DOI: 10.5555/2567709.2567736
15. Murtagh F., Contreras P. *Methods of hierarchical clustering*. 2011. arXiv preprint arXiv:1105.0121.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ЭЛЕКТРОННЫХ ПЕРЕХОДОВ АКРИДИНОВОГО ЖЕЛТОГО

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: 25.07.2020

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Акридиновый желтый (АУ, рис. 1) – высокофлуоресцентный краситель, который широко используется в цитологии для окрашивания клеток, в хроматографии для окрашивания ДНК, в качестве флуоресцентного маркера, для спектрофотометрического обнаружения следов примесей, в фотокатализе. АУ обладает фотосенсибилизирующим и фотодинамическим (антибактериальным) действиями.

При помощи оптических методов установлено, что АУ способен эффективно связываться с белками, ДНК, целлюлозой, мицеллами, золотыми поверхностями и наночастицами, квантовыми точками, а также другими малыми молекулами. В последнем случае наибольший интерес представляет перенос заряда в этих гетерокомплексах. Синтезированы полимерные производные АУ. К настоящему времени выполнен значительный объем экспериментальных исследований фотофизических свойств АУ методами фотолиза, ЭПР (триплетное состояние), флуорометрии, абсорбционной спектрофотометрии в растворах, матрице диоксида кремния и растянутых полимерных пленках.

В протонных растворителях АУ существует в катионной форме с протонированным гетероциклическим атомом азота (АУН⁺, рис. 1). В сильнощелочной среде и в апротонных растворителях АУ депротонируется с $pK_a=8.9$ (нейтральная форма АУ⁰) [1]. Растворы АУН⁺ и АУ⁰ проявляют слабый отрицательный сольватохромизм: при увеличении полярности растворителя максимум поглощения λ_{max} слабо смещается в коротковолновую область (гипсохромный сдвиг). Например, в хлороформе для АУН⁺ и АУ⁰ соответствующие величины λ_{max} составляют 446 нм и 397 нм, а воде 444 нм и 394 нм [2]. Это свидетельствует о большей стабилизации основного состояния молекулы более полярным растворителем по сравнению с возбужденным состоянием. Следовательно, величины основных состояний μ_{gs} АУН⁺ и АУ⁰ должны быть больше, чем дипольные моменты возбужденных состояний μ_{ex} [3]. В работе [4] для АУН⁺ теоретически вычислено $\mu_{gs} > \mu_{ex}$, но экспериментально получено $\mu_{gs} < \mu_{ex}$, что авторы объясняют сложным специфическим взаимодействием с растворителем, которое не описывается простой моделью диполя. В экспериментах по дихроизму обнаружено, что поглощение АУН⁺ в УФ области вызывает сильную поляризацию молекулы вдоль хромофора, а поглощение в видимой области приводит к слабой поляризации поперек хромофора; в случае АУ⁰ поглощение как в видимой, так и в УФ области вызывает поляризацию вдоль хромофора [5,6]. Агрегация АУ детально не изучалась; лишь в одной известной нам работе [7] было установлено, что максимум поглощения димера АУН⁺ в водном растворе

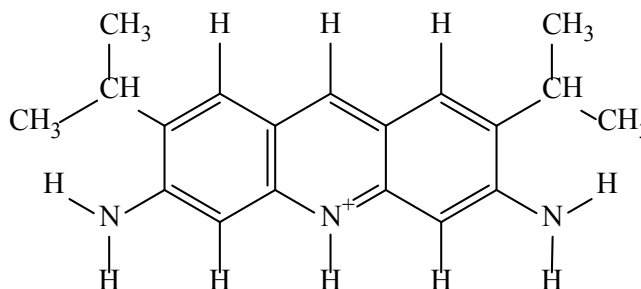


Рисунок 1. Химическая структура акридинового желтого

составляет $\lambda_{\max}=464$ нм. Нейтральная форма красителя AY^0 не агрегирует в растворе, а димер катиона AYH^+ не проявляет флуоресценции (как и другие акридиновые красители) [7].

Теоретическое исследование фотофизических свойств AY практически не проводилось. Только в упомянутой выше работе [4] методом квантовой химии PPP (Pariser-Pople-Parr) были вычислены дипольные моменты AYH^+ в основном и возбужденном состояниях. Также авторами [4] было установлено, что поляризация при возбуждении AYH^+ в видимой области происходит поперек хромофора. В настоящей работе при помощи нестационарной теории функционала плотности (Time-Dependence Density Functional Theory, TD-DFT [8]) нами выполнен расчет фотоиндуцированных электронных переходов в молекулах AYH^+ и AY^0 в водном растворе.

МЕТОДЫ

Исходная пространственная структура молекулы AY была взята из базы данных <http://www.chemspider.com> (ChemSpider ID 8348). Добавление атомов водорода и их предварительная оптимизация выполнялись при помощи программы HyperChem8.0. Все основные вычисления выполнялись при помощи программного пакета Gaussian16. Визуализация пространственных структур и поверхностей выполнена при помощи пакета GaussView. Водное окружение задавалось неявно при помощи модели поляризуемой сплошной среды (Polarizable Continuum Model-PCM), адаптированной для TD-DFT [9]. 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 AYH^+ и AY^0 выполнялся на уровне теории X3LYP/6-31G(d,p), который показал наилучшее совпадение расчетных максимумов поглощения с экспериментальными для водных растворов обеих форм красителя. Функционал X3LYP [11] представляет собой существенно усовершенствованную версию популярнейшего, но устаревшего функционала B3LYP.

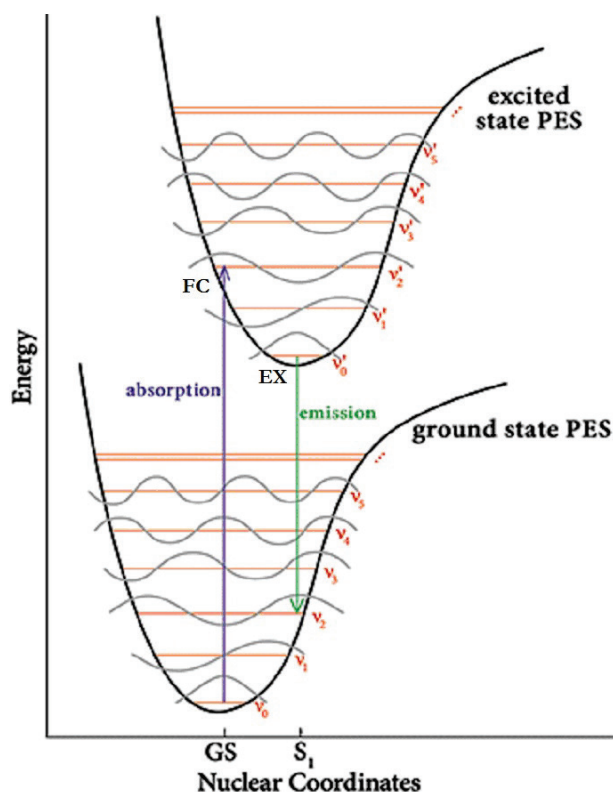


Рисунок 2. Энергетические диаграммы электронных и колебательных переходов [10]

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

AYH ⁺				
Переход	Задействованные орбитали	Вклад, %	Сила осциллятора <i>f</i>	Энергия перехода (эВ/нм)
S ₀ →S ₁	HOMO→LUMO	96	0,774	3,09/401
	(HOMO-1)→(LUMO+1)	4		
S ₀ →S ₂	(HOMO-1)→LUMO	99	0,007	3,16/392
S ₀ →S ₃	(HOMO-3)→LUMO	95	0,000	4,32/287
	(HOMO-1)→(LUMO+1)	3		
AY ⁰				
S ₀ →S ₁	HOMO→LUMO	99	0,023	3,13/396
S ₀ →S ₂	HOMO→(LUMO+1)	10	0,415	3,38/367
	(HOMO-1)→LUMO	89		
S ₀ →S ₃	(HOMO-3)→LUMO	87	0,001	4,10/302
	(HOMO-1)→(LUMO+1)	13		

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На уровне теории X3LYP/6-31G(d,p) катион AYH⁺ имеет 350 молекулярных орбиталей (МО), из которых 63 заняты, а 287 свободны. Таким образом, МО №63 является наивысшей занятой (HOMO), а МО №64 – наинизшей незанятой (LUMO). Нейтральная форма AY⁰ содержит 345 МО, из которых также 63 заняты, а 282 свободны. Как упоминалось выше, водный раствор катиона AYH⁺ имеет максимум поглощения в видимой области $\lambda_{\text{max}}=444$ нм ($\pi \rightarrow \pi^*$ переход). Согласно нашим расчетам, он обусловлен, главным образом, синглетным переходом HOMO→LUMO. При этом максимум поглощения водного раствора нейтральной формы AY⁰ $\lambda_{\text{max}}=394$ нм определяется переходом HOMO→(LUMO+1) (табл. 1).

Распределение электростатического потенциала в основном и возбужденных состояниях вблизи поверхности AY показано на рисунке 2 (оттенки красного соответствуют положительным значениям потенциала,

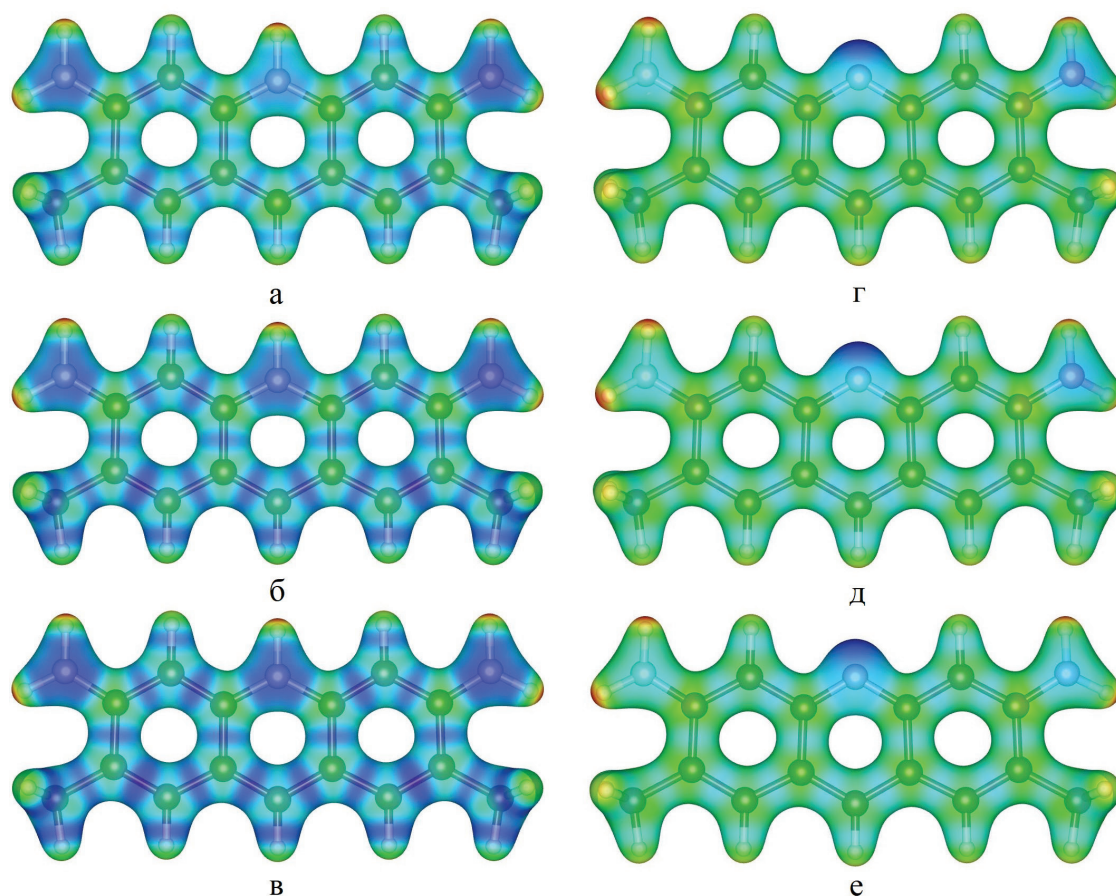
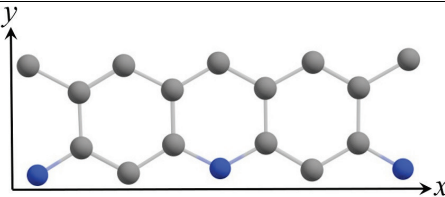
**Рисунок 3.** Визуализация электростатического потенциала молекул AYH⁺ и AY⁰ соответственно в основном (а,г), франк-кондоновском (б,д) и равновесном возбужденном (в,е) состояниях

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

 Координатные оси направлены вдоль главных осей инерции молекул			
Дипольный момент	Основное состояние	Франк-кондоновское состояние	Равновесное возбужденное состояние
AYH ⁺			
μ_x	0,0075	0,0067	0,0042
μ_y	-4,04	-5,86	-5,92
μ_z	0,0007	0,0006	-0,0001
μ	4,04	5,86	5,92
AY ⁰			
μ_x	0,0140	0,0123	0,0107
μ_y	-1,75	0,871	0,424
μ_z	0,0081	0,0078	0,0027
μ	1,75	0,871	0,424

синего – отрицательным). Как видно, данное распределение существенно различно для протонированной и непротонированной форм красителя. В то же время, между собой основное и возбужденные состояния для данной формы молекулы отличаются незначительно. Это свидетельствует о незначительном внутримолекулярном переносе заряда при фотовозбуждении как AYH⁺, так и AY⁰.

Результаты расчета дипольных моментов AYH⁺ (табл. 2) качественно согласуются с экспериментальными результатами [4] $\mu_{gs} > \mu_{ex}$, однако противоречат стандартной теории сольватохромизма (см. ВВЕДЕНИЕ). Для AY⁰, согласно нашим расчетам, $\mu_{gs} < \mu_{ex}$, что качественно согласуется с теорией.

ВЫВОДЫ

1. Поглощение света протонированной формой AYH⁺ соответствует электронному переходу S₀→S₁, HOMO→LUMO, а нейтральной AY⁰ – S₀→S₂, в основном HOMO→(LUMO+1) и, в значительно меньшей степени, (HOMO-1)→LUMO.
2. Распределение электронной плотности и электростатического потенциала существенно различаются для AYH⁺ и AY⁰.
3. Фотоиндуцированный перенос заряда незначителен как для AYH⁺, так и для AY⁰.
4. Расчетные дипольные моменты для AYH⁺ качественно соответствуют экспериментальным данным других авторов, но не согласуются со стандартной теорией сольватохромизма.
5. Расчетные дипольные моменты для AY⁰ согласуются с данной теорией.

Список литературы / References

1. Schulman S.G., Naik D.V., Capomacchia A.C., Roy T. Electronic Spectra and Electronic Structures of Some Antimicrobials Derived from Proflavine. *J. Pharm. Sci.*, 1975, vol. 64, pp. 982-986.
2. Eremenko A.M., Smirnova N.P., Kositskaya T.N., Chuiko A.A. Electron spectra of acridine yellow dye in the silicon dioxide matrix. *J. Appl. Spectrosc.*, 1984, vol. 41, pp. 1228-1231.
3. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.
4. Aaron J.J., Maafi M., Parkanyi C., Boniface C. Quantitative treatment of the solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra of acridines and phenazines. The ground and first excited singlet-state dipole moments. *Spectrochim. Act. A.*, 1995, vol. 51, pp. 603-615.
5. Yukio M., Kiwamu Y. Film Dichroism. II. Linearly-polarized Absorption Spectra of Acridine Dyes in the Stretched Poly (vinyl alcohol) Films. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1979, vol. 52, pp. 3163-3170.
6. Kiwamu Y., Mitsuaki S. Film Dichroism. VI. Linearly-polarized Absorption Spectra of Neutral and Divalent 3,6-Diaminoacridine Dyes in the Stretched Poly (vinyl alcohol) Film. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1983, vol. 56, pp. 55-59.
7. Zhang H.-M., Guo X.-Q., Zhao Y.-B., Wang D.-Y., Xu J.-G. Study on the dimer-monomer equilibrium of a fluorescent dye and its application in nucleic acids determination. *Anal. Chim. Act.*, 1998, vol. 361, pp. 9-17.
8. Cossi M., Barone V. Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions. *J. Chem. Phys.*, 2001, vol. 115, pp. 4708-4717.

9. Scalmani G., Frisch M.J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.*, 2010, vol. 132, p. 114110.
10. Foresman J.B., Frisch A.E. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, 3rd ed. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2015.
11. Xu X., Goddard W.A. The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, pp. 2673-2677.

THEORETICAL ANALYSIS OF PHOTO-INDUCED ELECTRONIC TRANSITIONS OF ACRIDINE YELLOW

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

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

МИГРАЦИЯ ОРЦИНОЛА ЧЕРЕЗ МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАНЫ *Escherichia coli*

Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф.

ФГБУН ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова

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

Поступила в редакцию: 27.07.2020

Аннотация. В работе методами классической молекулярной динамики исследуется влияние орцинола (3,5-дигидрокситолуола; 5-метилрезорцина) на модельные мембраны грамотрицательной бактериальной клетки *Escherichia coli* и миграция молекул орцинола через модельные мембраны и через поры внешней мембраны, образованные поринами. Оба слоя внутренней мембраны и внутренний монослой внешней мембраны смоделированы как смешанные слои 75% POPE / 25% POPG. Наружный монослой внешней мембраны состоит из липополисахаридов. Исследована динамика модельных мембран в присутствии орцинола. С помощью потенциала средней силы определены профили свободной энергии миграции молекулы орцинола через канал порина внешней мембраны и плазматическую мембрану. Обнаружено, что основным механизмом миграции молекул орцинола через мембраны являются непосредственно бислои. Показано, что молекулы орцинола могут как проникать внутрь клетки через мембраны и взаимодействовать с внутриклеточными структурами, так и легко встраиваться в бислой, изменяя их физико-химические параметры.

Ключевые слова: 5-метилрезорцин, орцинол, мембрана *E. coli*, молекулярная динамика, миграция малых молекул через бактериальную мембрану.

Изучение миграции малых молекул через мембраны бактериальных клеток представляет собой актуальную биомедицинскую задачу. Легко проникающие через мембрану малые молекулы, могут связываться с внутриклеточными белками и ДНК, модулируя их активность, служить индикаторами и изменять активность бактериальной клетки в целом. В работе исследуются молекулярные механизмы миграции одной из малых молекул - орцинола - через мембраны *E. coli*. Орцинол – природное соединение, которое синтезируется многими видами лишайников и относится к алкилрезорцинам (1,3-дигидроксibenзолам с алкильными заместителями в положениях 4 или 5), представляющим собой отдельный подкласс алкилированных гидроксибензолов (фенолов), обладающих широким спектром биологических функций и действующих как на клетки биологических организмов в целом, так и на отдельные клеточные структуры [1, 2]. Орцинол и его производные используются в биотехнологии, химии, фармакологии и находят биологическое применение в составе веществ, обладающих антиоксидантной и антибактериальной активностью. В связи с этим исследование молекулярных механизмов миграции этих молекул внутрь бактериальной клетки и его влияния на мембранные структуры клетки является актуальным.

Для определения структурных и энергетических характеристик молекулы орцинола были проведены *ab initio* расчёты. Использовался универсальный пакет квантово-химических программ FIREFLY [3], частично основанный на исходном коде пакета GAMESS (US) [4]. Основные расчёты проводились неограниченным методом Хартри-Фока (НХФ, UHF) [5]. Для аппроксимации электростатического потенциала с целью нахождения парциальных атомных зарядов использовался расширенный базисный набор, содержащий поляризационные и диффузные функции, 6-311++G(d,p), был использован алгоритм поиска электростатического потенциала GEODESIC. Необходимые внутри- и межмолекулярные константы находились с использованием наборов базисных функций 6-311G(d,p), 6-31G+(d). Проводилась процедура усреднения зарядов для симметричных атомов и их параметризация для молекулярно-динамического силового поля.

Клеточная оболочка *E. coli* обладает сложным строением и состоит из плазматической мембраны и клеточной стенки из пептидогликана и наружной мембраны. Барьерами к проникновению молекул в клетку являются плазматическая мембрана и клеточная стенка, образованная периплазматическим пространством (содержащим пептидогликан) и внешней мембраной [6]. Основными путями проникновения малых молекул в клетку могут служить как свободная диффузия через бислой, так и использование каналов белка порина, тримеры которых находятся во внешней мембране. Для моделирования каналов, в мембраны в процессе сборки встраивался тримерный интегральный белок порин OmpF (PDB ID: 1OPF), обеспечивающий пассивный транспорт небольших гидрофильных молекул через внешнюю мембрану *E. coli*. Для ускорения расчётов нахождения свободной энергии использовался встроенный в мембрану порин в мономерной форме.

Были разработаны модели мембран, содержащие основные типы головок липидов внутренней (плазматической) мембраны *E. coli* [7] – фосфатидилглицеролы и фосфатидилэтаноламины. Для сборки бислоев был использован пакет для комплексного биологического моделирования мембран CHARMM-GUI [8]. Оба слоя внутренней мембраны и внутренний бислой внешней мембраны были смоделированы как смешанные слои 75% POPE (ПОФХ, 1-пальмитоил-2-олеил-фосфатидилхолин) / 25% POPG (ПОФГ, 1-пальмитоил-2-олеил -sn-глицерин-3-фосфоглицерин). Наружный монослой внешней мембраны состоял из 100% липополисахаридов. Такой состав липидов и их соотношение могут служить простейшими моделями ровных участков (не изгибов, где ещё обязательно содержится кардиолипин) бактериальных мембран и хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными [6, 9-11].

Динамика систем рассчитывалась в программе Gromacs 2018 [12]. Комплекс DPS-ДНК был помещён в кубическую элементарную ячейку с ребром 24,23973 нм. Для нейтрализации заряда системы в ячейку были добавлены ионы Na^+ . Для сольватации систем использовалась модель воды SCE, также добавлялись ионы Na^+ , Cl^- в концентрации 150 мМ. Расчёты проводились в силовом поле AMBER99-PARMBS1 [13]. Проводилась минимизация энергии систем и последовательная релаксация в условиях постоянного объёма и затем давления длительностью по 100 пс. Вычисления динамики проводились в NPT ансамбле. Постоянная температура поддерживалась с помощью стохастического термостата; постоянное давление – с помощью термостата Парринелло-Рамана с постоянной времени 2 пс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Радиусы обрезания для кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий брались равными 1,5 нм. Температура системы составляла 373 К. Шаг интегрирования – 2 фс, длина траекторий – от 10 до 100 нс в зависимости от типа расчёта.

Исследована динамика модельных мембран в присутствии разных концентраций орцинола при температурах 300K, 310K, 320K. Для сравнения проведены исследования мембран состава 50% ДПФЭ / 50% ДПФГ. При всех исследованных температурных режимах наблюдалось проникновение молекул орцинола внутрь бислоя и прохождение их через бислой. На рис. 1а показано положение молекул орцинола относительно мембраны 75% POPE / 25% POPG в расчётный момент времени 36 нс, молекулы воды и ионы опущены. Видно, что молекулы орцинола не собираются в большие агрегаты, однако в системе постоянно присутствуют кластеры из 2-6 молекул. Орцинол легко переходит из кластеризованного в свободное состояние, а также легко проходит в мембрану, отрываясь от кластеров. Распределение плотности атомов относительно центра мембраны показывает, что предпочтительное положение молекул орцинола в мембране – в области перехода между липидными головками и хвостами липидов (рис. 2б). Расчёт площади, приходящейся на молекулу липида показывает, что средняя площадь на липид в присутствии орцинола увеличивается примерно на 5%; для 75% POPE / 25% POPG при 310K с $55 \text{ \AA}^2$ до $57,5 \text{ \AA}^2$. Таким образом видно, что молекулы орцинола могут свободно диффундировать через бислой, проникая к внутренним структурам клетки.

Одной из задач исследования было определить, каким образом молекулы орцинола могут проникать через внешнюю мембрану *E. coli*. Расчёты проводились для систем 1) бислоя и 2) мономера порина, встроенного в тот же бислой. С помощью потенциала средней силы определены профили свободной энергии миграции молекулы орцинола в этих системах (рис. 2). В рамках метода зонтичной выборки к молекуле орцинола прикладывался дополнительный потенциал. Гармоническая силовая константа потенциала, воздействующего на молекулу орцинола, была равна $1000 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{нм}^{-2}$, скорость изменения исходного положения молекулы – 0,01 нм/пс. Проведены расчёты 10-наносекундных траекторий для 400 точек, выбранных вдоль координаты миграции орцинола – от -3,5 нм до 3,5 нм вдоль оси, перпендикулярной плоскости бислоя. Профиль свободной энергии восстановлен методом взвешенных гистограмм. Расчёт свободной энергии миграции орцинола через порин (синяя кривая) показывает, что существует значительный энергетический барьер на пути миграции орцинола внутрь клетки через пориновые каналы. Несмотря на небольшой размер гидрофобного «хвоста» молекулы орцинола ($-\text{CH}_3$), этот участок молекулы способствует взаимодействию орцинола с петлёй L6 порина (P239 I T N K F T N T S G F250), ответственной за переход канала этого белка из открытого в закрытое состояние [14]. Связывание орцинола с петлёй L6 порина и конформационные переходы в этой области белка определяют видимые на графике колебания в области 0-3 нм, значительно замедляющие диффузию молекулы орцинола через канал порина. То есть, основным путём миграции орцинола является свободная диффузия через бислой (красная кривая). Энергетический барьер составляет 20-25 ккал/моль. Для ускорения расчётов в задаче поиска свободной

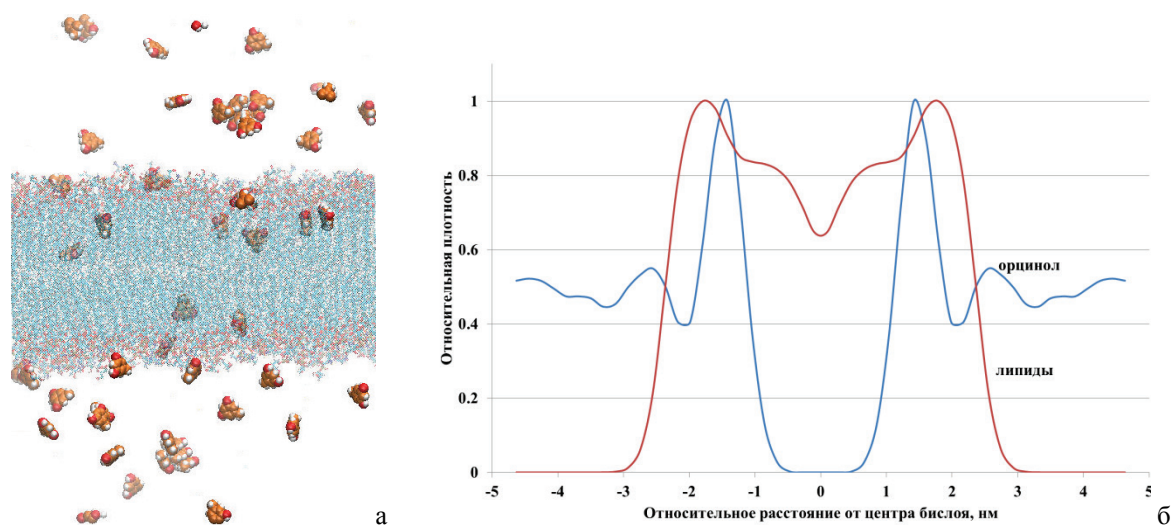


Рисунок 1. а – Положение молекул орцинола (атомы показаны ван-дер-ваальсовыми шариками) относительно внутренней мембраны *E. coli* на 36 нс расчёта. б – относительная плотность распределения атомов орцинола и липидов за 50 нс траектории. Расчёт мембраны 75% POPE / 25% POPG при 310 K

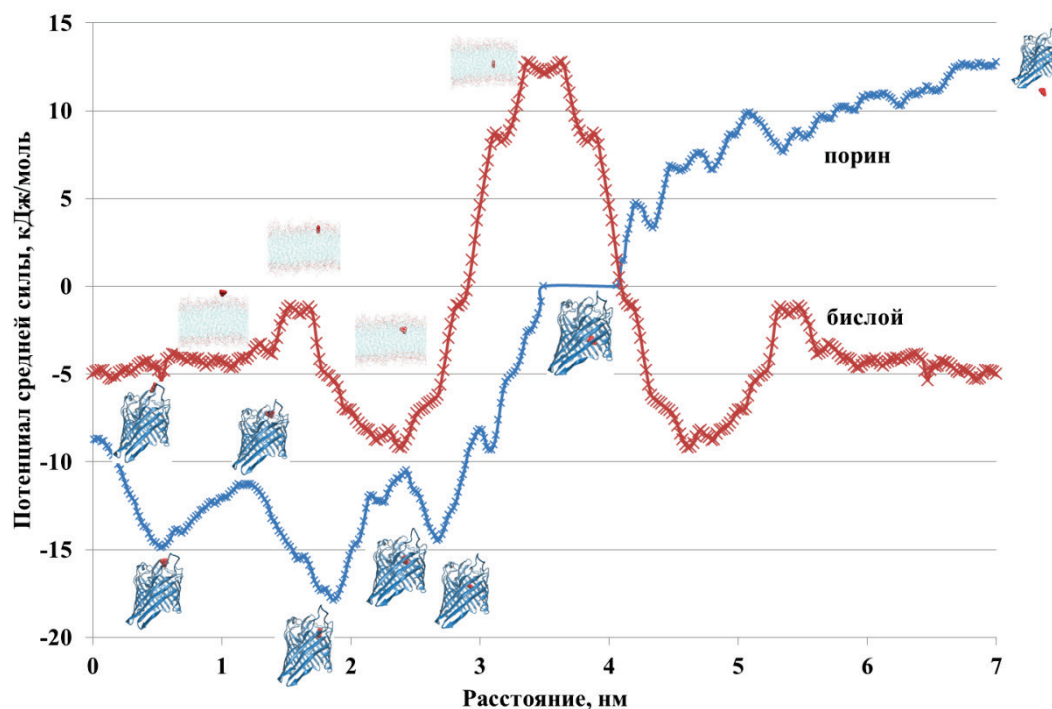


Рисунок 2. Профиль потенциала средней силы между молекулами орцинола и порина (синяя кривая); орцинола и бислоевой мембраной (красная кривая) в зависимости от расстояния между их центрами. На рисунках показаны уменьшенные изображения порина и мембраны, на которых красным выделено соответствующее положение орцинола

энергии в систему не были включены молекулы липополисахаридов, однако молекулярно-динамические исследования бислоёв, содержащих этот тип молекул показывают, что полисахаридные слои не связывают орцинол и не препятствуют его проникновению к головкам липидов.

Таким образом, полученные в результате исследования данные показывают, что молекулы орцинола могут свободно диффундировать через бислои внутренней и внешней мембран *E. coli*, что позволяет им связываться с внутриклеточными структурами и оказывать влияние непосредственно на белки и ДНК внутри клетки *E. coli*. Орцинол также оказывает влияние непосредственно на мембраны, немного (примерно до 5%) увеличивая площадь на липид. По-видимому, каналы пориновых белков не являются основным путём миграции орцинола внутрь клетки из-за связывания метильной группы с петлёй L6 порина.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (Тема 0082-2019-0015, № АААА-А20-120031490003-7, Тема 0104-2019-0005). Расчеты проводились на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МСЦ РАН), проект СНРН2.

Список литературы / References:

1. Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г. и др. Влияние химических шаперонов на свойства лизоцима и белка реакционного центра бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. *Биофизика*, 2011, т. 56, № 1, с. 13-30. [Krupyanskiy Yu.F., Noks P.P., Lojko N.G. et al. Vliyanie himicheskikh shaperonov na svoystva lizocima i belka reakcionnogo centra bakterij *Rhodobacter sphaeroides*. *Biofizika*, 2011, vol. 56, no. 1, pp. 13-30. (In Russ.)]
2. Терешкина К.Б., Степанов А.С., Сеницын Д.О., Крупянский Ю.Ф. Влияние малых лигандов и их комплексов на свойства белка лизоцима. *Химическая физика*, 2014, т. 33, № 7, с. 64-73. [Tereshkina K.B., Stepanov A.S., Sinicyn D.O., Krupyanskiy YU.F. Vliyanie malyh ligandov i ih kompleksov na svoystva belka lizocima. *Himicheskaya fizika*, 2014, vol. 33, no. 7, pp. 64-73. (In Russ.)]
3. Granovsky A.A. Firefly version 8. [www http://classic.chem.msu.ru/gran/firefly/index.html](http://classic.chem.msu.ru/gran/firefly/index.html)
4. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A. General atomic and molecular electronic structure system. *J.Comput.Chem.*, 1993, vol. 14, pp. 1347-1363. DOI: 10.1002/jcc.540141112.
5. Foresman J.B., Frisch A. *Exploring chemistry with electronic structure methods* 2ed. Gaussian, Inc. Pittsburgh, PA, 1996, pp. 107-116.
6. Warren E. Levinson, *Review of Medical Microbiology and Immunology*, 11th Edition. Publisher: McGraw-Hill Medical, 2010, 640 p.
7. Sohlenkamp C., Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, vol. 40, iss. 1, pp. 133-159. DOI: 10.1093/femsre/fuv008.

8. Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A., Wei S., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L. III, MacKerell A.D. Jr, Klauda J.B., Im W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.*, 2016, vol. 12, pp. 405-413. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00935.
9. Oursel D., Loutelier-Bourhis C., Orange N., Chevalier S., Norris V., Lange C.M. Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, vol. 21, no. 20, pp. 1721-1728. DOI: 10.1002/rcm.3013.
10. Oursel D., Loutelier-Bourhis C., Orange N., Chevalier S., Norris V., Lange C.M. Identification and Relative Quantification of Fatty Acids in *Escherichia Coli* Membranes by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2007, vol. 21, no. 20, pp. 3229-3233. DOI: 10.1002/rcm.3177.
11. Frauenfeld J., Gumbart J., van der Sluis E.O., Funes S., Gartmann M., Beatrix B., Mielke T., Berninghausen O., Becker T., Schulten K., Beckmann R., Cryo E.M. structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, vol. 18, pp. 614-621.
12. Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, vol. 4, pp. 435, DOI: 10.1021/ct700301q.
13. Ivani I., Dans P.D., Noy A. et al. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations. *Nat Methods*, 2015, vol. 13, no. 1, p. 55. DOI : 10.1038/nmeth.3658.
14. Yildiz O., Vinothkumar K.R., Goswami P., Kühlbrandt W. Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation [published correction appears in *EMBO J.* 2006 Nov 1;25(21):5240]. *EMBO J.*, 2006, vol. 25, no. 15, pp. 3702-3713. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601237.

ORCINOL MIGRATION THROUGH MODEL MEMBRANES OF *Escherichia coli*

Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyanskii Y.F.

Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences
Kosygina str., 33, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ramm@mail.ru

Abstract. In this work, the influence of orcinol (3,5-dihydroxytoluene; 5-methylresorcinol) on model membranes of a gram-negative bacterial cell of *Escherichia coli* and the migration of orcinol molecules through model membranes and through the pores of the outer membrane formed by porins were investigated using the methods of classical molecular dynamics. Both the inner membrane leaflets and the inner leaflet of the outer membrane were modeled as mixed layers of 75% POPE / 25% POPG lipids. The outer leaflet of the outer membrane was composed of lipopolysaccharides. The dynamics of model membranes in the presence of orcinol was studied. Using the potential of mean force, the free energy profiles of migration of the orcinol molecule through the porin channel and the membrane were determined. It was found that the main mechanism of migration of orcinol molecules into the cell is diffusion through bilayers. It has been shown that orcinol molecules can both penetrate into the cell through membranes for interaction with intracellular structures, and can easily integrate into bilayers, changing their physicochemical parameters.

Key words: 5-methylresorcinol, orcinol, *E. coli* membrane, molecular dynamics, migration of small molecules through the bacterial membrane.

ДЕТЕРГЕНТ-РЕЗИСТЕНТНЫЕ МЕМБРАНЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА: ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА НА ИХ МОДИФИКАЦИЮ

Гармаза Ю.М.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru
Поступила в редакцию: 19.07.20

Аннотация. Установлено, что ионы цинка при действии на эритроциты человека *in vitro* не оказывают видимого влияния на количество и степень упаковки детергент-резистентных мембран (липидных рафтов), с одной стороны, но в то же время модифицируют их структуру (изменяя локализацию как белка-маркера липидных рафтов – стоматина, так и интегрального белка – белка полосы 3) и изменяют латеральное распределение холестерина в цитоплазматической мембране. Показано, что разрушение детергент-резистентных участков мембраны эритроцитов в результате экстракции холестерина *in vitro* приводит к потере функциональной активности мембраносвязанного интегрального белка-транспортера MRP1.

Ключевые слова: эритроциты человека, липидные рафты, мембранный холестерин, ионы цинка, белок MRP1.

Известно, что структурное и функциональное состояние плазматической мембраны играет важную роль в формировании ответа клетки на действие различных ксенобиотиков. В свою очередь, липиды в биологических мембранах выполняют различные функции: обеспечивают структурную организацию и стабильность клеточных мембран; выполняют барьерную и транспортную функции; играют фундаментальную роль в передаче информации и регулировании метаболических процессов в клетке [1, 2]. В последнее время наблюдается значительный интерес исследователей к физиологической роли именно холестерина, как одного из важнейших компонентов мембран эукариотических клеток. Показано, что плазматическая мембрана содержит более высокий уровень холестерина по сравнению с внутриклеточными мембранами органелл [3], а в эритроцитах человека содержание холестерина достигает до 30% от всех мембранных липидов [2]. Известно, что холестерин включается в специализированные микродомены или “рафты” и играет ключевую роль в их формировании [4, 5]. Известно, что эти микродомены ассоциируются с цитоскелетом клетки и являются платформами для локализации различных мембранных белков. В эритроцитах, например, это стоматин, G-белки, флотиллины [6]. Считается, что именно липидные рафты играют важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации и мембранного транспорта [5].

Как известно, функционирование интегральных мембранных белков часто находится под влиянием состава и физического состояния липидных молекул, которые окружают их в мембране [2]. В связи с этим в настоящее время активно обсуждается вопрос о зависимости функции мембраносвязанных белков-транспортеров от их липидного окружения, в частности от их локализации в специализированных микродоменах или “рафтах” мембран, одним из ключевых компонентов которых и является холестерин.

Ранее нами было обнаружено, что 2-х часовое воздействие сульфата цинка в фармакологических и токсичных концентрациях на эритроциты человека *in vitro* приводит к 20–30% аккумуляции в них Zn^{2+} , что сопровождалось увеличением уровня свободных SH- и NH_2 -групп на поверхности их мембран, а также модификацией физического состояния липидного бислоя [7, 8]. Также было показано, что это играет важную роль в нарушении транспортной функции мембраносвязанных белков-транспортеров ксенобиотиков семейства MRP (а именно MRP1 белка) в эритроцитах человека, функционирование которых ассоциировано с состоянием липидного бислоя. В связи с этим, была выдвинута гипотеза, что одним из возможных механизмов обнаруженных Zn-индуцированных изменений является нарушение структуры и функции специализированных гликолипидных микродоменов или липидных рафтов [9, 10].

Цель работы – проверка гипотезы, что одним из механизмов Zn-индуцированных мембранотропных изменений, а также модификации функционирования интегрального белка MRP1 в эритроцитах человека, является модификация латерального распределения холестерина и структуры липидных рафтов в цитоплазматической мембране.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использована кровь здоровых доноров в консерванте “гепарин”, полученная из Pavia Hospital Yauso (Павия, Италия) и РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь).

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000g в течение 10 мин и трижды отмывали в 155 mM NaCl. Эритроцитарные мембраны выделяли по методу Доджа и сотр. Концентрацию белка в телях эритроцитов измеряли по модифицированному методу Лоури. Нагрузку эритроцитов ионами цинка проводили путем инкубации суспензии клеток с сульфатом цинка в фармакологической (0,05 mM) и токсичной (0,5 mM) концентрациях в 10 mM трис-HCl буфере, содержащем 155 mM NaCl, pH 7,4 (2 ч, 37°C).

Липидные рафты (или изолированные из эритроцитарных мембран детергент-резистентные участки мембран, DRMs) были экстрагированы из цельных эритроцитов до и после нагрузки их ионами цинка в градиенте сахарозы (80%) в 5 мМ HEPES буфере (HKM буфер), содержащий 150 мМ KCl, 8 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, pH 7,4 с добавлением 1%-го тритона X-100 (1-й подход) или сахарозы (80%) в 0,3М K₂CO₃ (2-й подход) и подвержены центрифугированию 225000 g при 4°C в течение 16 ч, используя центрифугу (Optima Max BC, Италия). После ультрацентрифугирования суспензия эритроцитов разделялась на 6 фракций, которые были собраны по 1 мл и подвержены дальнейшему анализу.

Оценку модификации DRMs проводили по анализу следующих мембранносвязанных белков: флотилин-2, стоматин, белок полосы 3, с помощью методов электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинга с применением специфических антител: моноклональные антитела мыши анти-флотилин-2 (BD, разведение 1:2000), моноклональные антитела кролика анти-стоматин (H-49) (SC, 1:1000), моноклональные антитела мыши анти-B3 (Sigma, 1:15000). Связывание первичных антител оценивалось после инкубации со вторичными антителами (антитела против IgG мыши или кролика, соответственно, Sigma, 1:15000), конъюгированными с пероксидазой хрена, с последующей хемилюминесцентной детекцией (BD, Италия).

О модификации латерального распределения холестерина в мембранах эритроцитов, подвергшихся воздействию ионов цинка, судили по величине интенсивности флуоресценции полиенового антибиотика филипина. Для этого изолированные мембраны эритроцитов, предварительно нагруженные сульфатом цинка, инкубировали 2 ч при комнатной температуре в темноте с раствором филипина в ДМСО (конечная концентрация филипина в образце 5 мкМ). Интенсивность флуоресценции ($I_{\text{фл}}$) измеряли при $\lambda_{\text{возб/рег}}=340/482$ нм

Для истощения эритроцитов по холестерину клетки до нагрузки ионами цинка инкубировали в присутствии метил- β -циклодекстрина (M β CD) в концентрации 0,5 мМ в течение 30 мин при 37°C, затем суспензию эритроцитов центрифугировали при 2000g 10 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали в трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащий 155 мМ NaCl. Содержание мембранного холестерина до и после истощения в эритроцитах определяли с помощью стандартного набора ("Анализ-Х", Беларусь), солубилизацию мембран проводили в 2 % растворе тритона X-100.

Об изменении функциональной активности белка-транспортера MRP1 в эритроцитах судили по скорости транспорта конъюгатов биман-S-глутатиона (B-SG) по флуоресцентному методу. Для этого эритроциты, предварительно обработанные M β CD или M β CD+сульфат цинка, ресуспензировали в буфере А, содержащем 138 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 6,1 мМ Na₂HPO₄; 1,4 мМ NaH₂PO₄; 1 мМ MgCl₂; 1 мг/мл глюкозы pH 7,4, инкубировали в течение 5 мин с 10 мкМ монохлорбимана (mBCl) при комнатной температуре. Затем клетки ресуспензировали в буфере А до 5%-го гематокрита, инкубировали при 37°C и через определенные промежутки времени (0 мин; 3 мин; 6 мин; 9 мин и 12 мин) центрифугировали при 2000g, 5 мин. Собирали супернатанты и измеряли интенсивность флуоресценции при $\lambda_{\text{возб/рег}}=386/476$ нм. Спонтанный гемолиз в экспериментах не превышал 1-2%.

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре Srescord M-40 (Германия). Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Уилкоксона в программе STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения участия холестерина в ответах мембраны на действие ионов цинка нами были экстрагированы детергент-резистентные участки мембран (DRMs) из эритроцитов, обработанных сульфатом цинка в концентрациях 0,05 и 0,5 мМ. Для этого использовалась методика, предложенная авторами работы [11, 12], когда суспензия эритроцитов в градиенте плотности сахарозы в 0,3М K₂CO₃ подвергалась ультрацентрифугированию (225 000 g при 4°C в течение 16 ч) в результате чего происходит разделение клетки на 6 фракций, которые анализировались на наличие в них следующих мембранносвязанных белков: флотилин-2, стоматин, белок полосы 3. Стоит отметить, что именно 2-я фракция представляет собой DRMs (рис. 1) [11]. Более того, из рисунка 1 видно, что в результате применения 1-го подхода с использованием HEPES буфера для растворения сахарозы (3 пробирка) не происходит четкого фракционирования DRM-полосы. Именно карбонаты необходимы для получения DRM-полосы с плотностью, которая соответствует плотности DRMs, описанной в литературе для других типов клеток (5-30 % сахароза) [11]. Анализ фракции DRMs в суспензии как интактных, так и Zn-нагруженных эритроцитов не выявил видимых различий в количестве полос и степени их упаковки до и после воздействия ионов цинка (рисунок 1). Таким образом, можно заключить, что взаимодействие Zn²⁺ с мембранами эритроцитов не оказывает влияния на уровень мембранного холестерина и/или сфинголипида (как основных рафтовых липидов).

Параллельно с этим с помощью полиенового антибиотика филипина была изучено изменение латерального распределения холестерина в мембранах в ответ на модификацию эритроцитов сульфатом цинка. В настоящее время установлено, что филипин, обладающий собственной флуоресценцией с максимумом при 482 нм ($\lambda_{\text{возб}}=340$ нм) и взаимодействующий с холестерин-содержащими участками мембран клеток. В связи с этим он может быть использован как зонд на присутствие и гетерогенность распределения стеролов в биологических мембранах [13]. Из представленных на рисунке 2 данных видно, что при воздействии на эритроцитарные

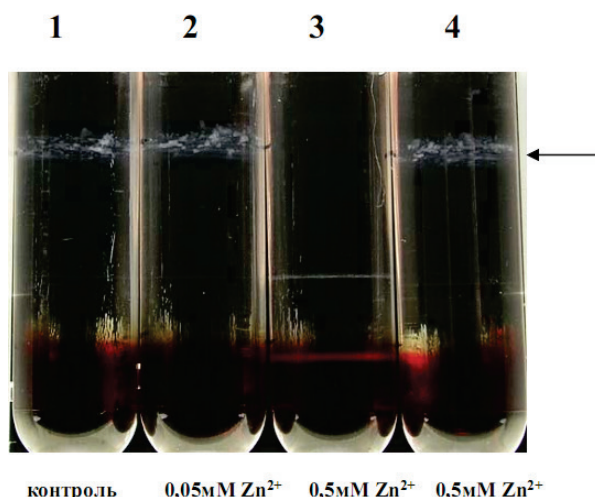


Рисунок 1. Изолирование детергент-резистентных участков мембран (“рафтов”) из эритроцитов человека до и после обработки сульфатом цинка. Эритроциты, нагруженные Zn^{2+} и интактные, обрабатывались тритоном X-100 в НКМ буфере, смешивались с равными объемами 80% сахарозы в НКМ буфере (пробирка 3) или 80% сахарозы в 0,3 М K_2CO_3 (пробирки 1, 2, 4) и ультрацентрифугировались в течение 16 ч ($220000g$, $4^\circ C$). Стрелкой обозначена фракция DRMs.

мембраны сульфата цинка в концентрациях 0,05 и 0,5 мМ происходит дозозависимое снижение интенсивности флуоресценции филипина. Это указывает на увеличение количества доступного холестерина для этого антибиотика, что может свидетельствовать о модификации его латерального распределения в плазматических мембранах, несмотря на отсутствие изменения уровня мембранного холестерина (рис. 1).

На следующем этапе работы были изучены локализация и количество как белков-маркеров DRMs (флотилин-2 и стоматин) [2, 5], так и нерафтовых белков – белка полосы 3 [2], в каждой изолированной фракции. Было показано, что белок-маркер DRM – флотилин-2 (47 кДа), находится только во фракции липидных рафтов, в то время, как во фракциях 3-6 он не обнаружен ни в контрольных образцах, ни в образцах, подвергшихся воздействию Zn^{2+} (рис. 3А). При этом плотность белка и его локализация не зависела от концентрации Zn^{2+} в среде инкубации и отличий от контрольных образцов обнаружено не было. В то же время, были обнаружены различия в количестве и локализации другого белка-маркера DRM – стоматина (32 кДа) (рис. 3Б). В образцах, подвергшихся воздействию Zn^{2+} в исследуемых концентрациях, белок был обнаружен также в нерафтовых фракциях, чего не наблюдалось в образцах интактных клеток, а плотность полосы белка в рафтовой зоне была выше, по сравнению с интактными клетками.

Как известно, одним из участников активного транспорта может быть основной интегральный белок мембраны эритроцитов – белок полосы 3, важнейшей функцией которого является транспорт анионов через

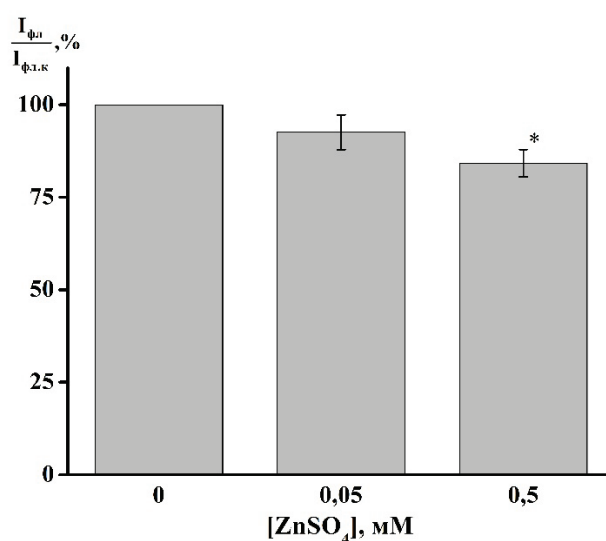


Рисунок 2. Относительная интенсивность флуоресценции полиенового антибиотика филипина, встроенного в мембраны эритроцитов человека, модифицированных сульфатом цинка в широком спектре концентраций. За 100% принято значение интенсивности флуоресценции филипина в интактных мембранах (контроль); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($P < 0,05$); $\lambda_{\text{возб}} = 340$ нм; $\lambda_{\text{рег}} = 482$ нм

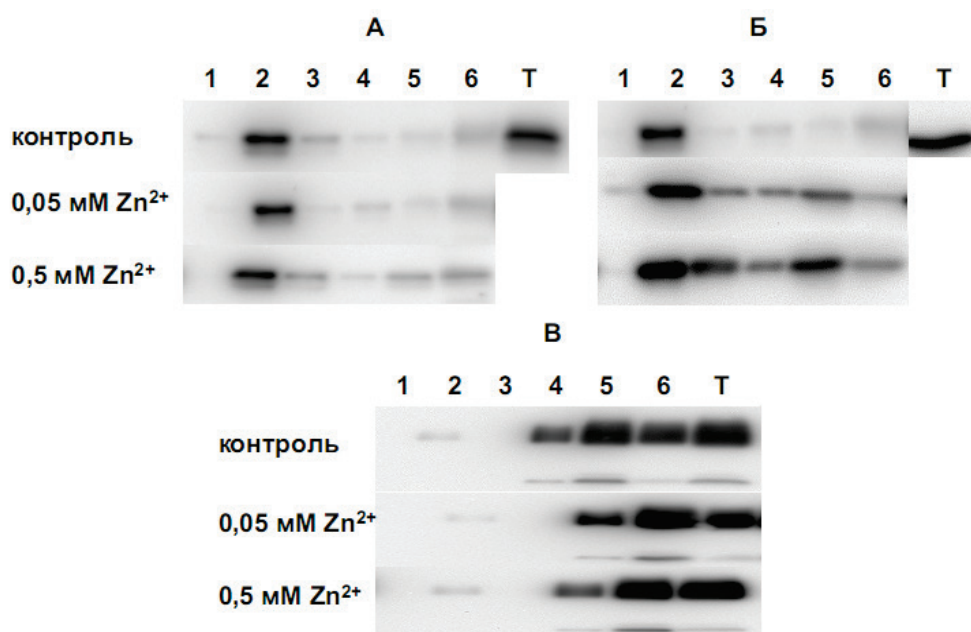


Рисунок 3. Анализ белков-маркеров DRM флотиллина (flot-2, MW=45) (а) и стоматина (stom, MW=31) (б), а также нерафтового белка – белка полосы 3 (B3, MW=95) (в), используя моноклональные антитела. Образцы общей популяции эритроцитов (Т) перед лизисом с помощью тритона X-100 были использованы в качестве сравнения

плазматическую мембрану. Используя метод вестерн-блоттинга, нами было выявлено уменьшение количества белка полосы 3 в рафтовой зоне клеток, подвергшихся воздействию Zn^{2+} по сравнению с контрольными образцами (рис. 3В). Ранее было установлено, что Zn^{2+} в концентрации 0,05 mM индуцирует конформационные изменения в цитоплазматическом домене белка полосы 3, которые, в свою очередь, передаются мембранному домену, в результате чего происходит ингибирование его анион-транспортной активности [14]. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее, о Zn -индуцированной модификации транспортной функции другого интегрального белка-транспортера семейства MRP – MRP1, отвечающего за экспорт ксенобиотиков из эритроцитов [9, 10].

Для уточнения вопроса о возможном участии мембранного холестерина в изменениях функциональной активности белка-транспортера MRP1 в эритроцитах человека, модифицированных ионами цинка, был использован циклический олигосахарид метил- β -циклодекстрин (M β CD), обладающий наибольшим сродством к этому липиду и эффективно экстрагирующий его из клеточных мембран [15]. Известно, что степень истощения мембранного холестерина зависит от концентрации M β CD, времени инкубации с ним, температуры и типа клеток. Ранее нами были подобраны все необходимые экспериментальные условия для эффективной экстракции холестерина из эритроцитарной мембраны с помощью M β CD [16].

Как видно из репрезентативных данных, представленных на рисунке 4, после экстракции 20–25% холестерина из мембран эритроцитов наблюдалось снижение скорости выхода конъюгатов биман-S-глутатион из клеток до 45% (кривая 2), свидетельствующее об ингибировании функциональной активности белка-транспортера MRP1. В тоже время инкубация эритроцитов, предварительно истощенных по холестерину, с сульфатом цинка не приводила к видимым изменениям транспортной активности этого белка по сравнению с M β CD-обработанными клетками (кривые 2 и 3), что свидетельствует о полной потере функциональной активности данного белка при разрушении детергент-резистентных участков мембраны. Полученные результаты свидетельствуют, что ионы цинка индуцировали активацию MRP1 транспортера [9, 10] за счет модификации именно мембранного холестерина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ионы цинка при взаимодействии с плазматической мембраной эритроцитов модифицируют латеральное распределение мембранного холестерина, что, в свою очередь, играет важную роль в функционировании интегрального белка-транспортера MRP1. Одним из возможных механизмов этих Zn -индуцированных изменений является нарушение структуры (модифицируя локализацию как белка-маркера “рафтов” – стоматина, так и интегрального белка – белка полосы 3) и функции специализированных гликолипидных микродоменов или “рафтов”, в состав которых входит холестерин.

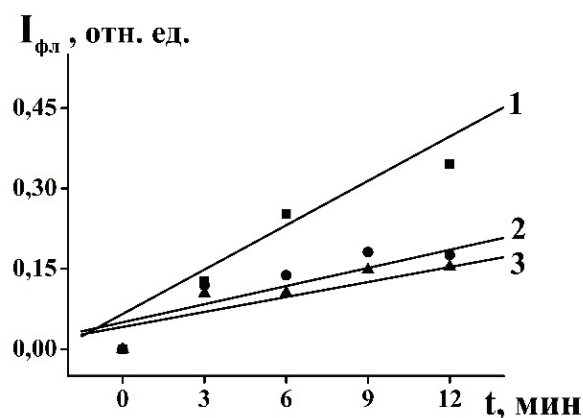


Рисунок 4. Влияние метил- β -циклодекстрина на кинетику выхода конъюгатов биман-S-глутатион из эритроцитов человека

1 – интактные эритроциты; 2 – эритроциты, подвергшиеся воздействию М β CD в концентрации 4мМ; 3 – эритроциты, подвергшиеся воздействию 4 мМ М β CD+0,1 мМ ZnSO₄; t – время инкубации при 37°C; I_{фл.} – интенсивность флуоресценции конъюгатов биман-S-глутатион; ($\lambda_{возб./пер.}$ =386/476 нм)

Работа частично выполнена при финансовой поддержке Фонда Карипло (Италия). Выражаю благодарность заведующему лабораторией биохимии Университета Павии, Факультета биологии и биотехнологии (г. Павия, Италия) проф. Дж. Минетти и ведущему научному сотруднику данной лаборатории PhD А. Чиана за помощь в постановке экспериментов по выделению и изучению липидных рафтов.

Список литературы / References:

1. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, vol. 99, no. 4, pp. 1943-1948. DOI: 10.1073/pnas.042688399.
2. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск: Наука и техника, 1981, 215 с. [Chernitsky E.A., Vorobei A.V. *Structure and functions of erythrocyte's membranes*. Mn: «Science and Technology», 1981, 215 p. (In Russ.)]
3. Slotte J.P., Bierman E.L. Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochemical Journal*, 1988, vol. 250, pp. 653-658. DOI: 10.1042/bj2500653.
4. Simons K., Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science*, 2000, vol. 290, pp. 1721-1726. DOI: 10.1126/science.290.5497.1721.
5. Петрович В.А., Слобожанина Е.И. Липидные рафты в биологических мембранах. *Новости медико-биологических наук*, 2013, т. 7, № 1, с. 69-75. [Petrovich V.A., Slobozhanina E.I. Lipid rafts in biological membrane. *News of biomedical sciences*, 2013, vol. 7, no. 1, pp. 69-75. (In Russ.)]
6. Salzer U., Prohaska R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood*, 2001, vol. 97, pp. 1141-1143. DOI: 10.1182/blood.V97.4.1141.
7. Гармаза Ю.М. Холестерин и Zn-индуцированные изменения мембран. *Наука и инновации*, 2008, № 9 (67), с. 40-42. [Harmaza Y.M. Cholesterol and Zn-induced membranes alterations. *Science and innovations*, 2008, no. 9 (67), pp. 40-42. (In Russ.)]
8. Khairullina A.Ya., Ol'shanskaya T.V., Filimonenko D.S., Kozlova N.M., Garmaza Yu.M., Slobozhanina E.I. Optical, nanostructural, and biophysical properties of Zn-induced changes in human erythrocyte membranes. *Optics and Spectroscopy*, 2011, vol. 110, no. 4, pp. 534-540. DOI: 10.1134/S0030400X11040138.
9. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Изменение функциональной активности белков, ответственных за экспорт ксенобиотиков из эритроцитов человека, при действии ионов цинка. *Приложение к журналу "Известия НАН Беларуси"*, 2012, ч. 3, с. 40-43. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V. Change of the functional activity of proteins responsible for export xenobiotics from human erythrocytes under zinc ions influence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2012, iss. 3, pp. 40-43. (In Russ.)]
10. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Редокс-статус и функциональная активность ABCC белков в эритроцитах человека при действии ионов цинка. *Медицинский академический журнал*, 2012, с. 258-260. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V. Redox state and functional activity of ABCC proteins in human erythrocytes under zinc ions actions. *Medical Academic Journal*, 2012, pp. 258-260. (In Russ.)]
11. Ciana A., Achilli C., Balduini C., Minetti G. On the association of lipid rafts to the spectrin skeleton in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1808, pp. 183-190. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.08.019.
12. Ciana A., Achilli C., Minetti G. Membrane rafts of the human red blood cell. *Molecular Membrane Biology*, 2014, vol. 31, no. 2-3, pp. 47-57. DOI: 10.3109/09687688.2014.896485.

13. Castanho M., Coutinho A., Prieto M. Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, vol. 267, no. 1, pp. 204-249.
14. Xu H., Zhang X., Yang F.Y. Further studies on Zn^{2+} -mediated domain-domain communication in human erythrocyte band 3. *Bioscience Reports*, 1998, vol. 18, no. 5, pp. 265-277. DOI: 10.1023/A:1020161032473.
15. Ohtani Y., Irie T., Uekama K., Fukunaga K., Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 1989, vol. 186, no. 1-2, pp. 17-22. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15171.x.
16. Гармаза Ю.М. Транспорт конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека при истощении холестерина. Приложение к журналу "Известия НАН Беларуси", 2010, ч. 4, с. 50-54. [Harmaza Y.M. Transport of GSH-conjugates in human erythrocytes after cholesterol depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2010, iss. 4, pp. 50-54. (In Russ.)]

DETERGENT-RESISTANT MEMBRANES IN HUMAN ERYTHROCYTES: INFLUENCE OF ZINC IONS ON THEIR MODIFICATION

Harmaza Y.M.

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

Abstract. It was obtained that zinc ions under interaction with human erythrocytes *in vitro* haven't a visible effect on the quantity and degree of packing of detergent-resistant membranes (DRMs) or lipid rafts. At the same time, zinc ions can modify the lipid rafts structure (changing the localization as a protein-DRM marker – stomatin, as an integral protein – protein band 3) and lateral distribution of cholesterol in the erythrocyte membranes. Moreover, it was shown that DRMs destruction in human erythrocytes as a result of *in vitro* extraction of membrane cholesterol leads to a loss of the functional activity of the membrane-bound integral protein-transporter MRP1.

Key words: human erythrocytes, lipid rafts, membrane cholesterol, zinc ions, protein MRP1.

СОЛИТОННАЯ ДОСТАВКА ВОЗБУЖДЕНИЙ И СТИМУЛИРОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Аширметов А.Х.¹, Искандарова Ф.², Никифорова Н.Н.³, Оксенгендлер Б.Л.^{3,4}

¹ Институт гематологии МЗ РУз

Чиланзар-6, 42А, г. Ташкент, 1060185, Узбекистан

² Центр профилактики чумы, карантинных и особо опасных инфекций, Ферганский филиал

ул. Янги Фаргона, 59, г. Янги Маргилон, 150113, Узбекистан

³ Институт ионно-плазменных и лазерных технологий АН РУз

ул. Дурмон йули, 33, г. Ташкент, 100125, Узбекистан

⁴ Институт химии и физики полимеров АН РУз

ул. А. Кадыри, 7Б, г. Ташкент, 100128, Узбекистан; e-mail: oksengendlerbl@yandex.ru

Поступила в редакцию: 21.07.20

Аннотация. В статье изучается актуальная проблема доставки лекарств на принципиально новой основе. В противовес идеи использования наночастиц типа «core shell», где core – лечащее вещество, а shell – органическое покрытие преодолевающее физиологические барьеры, новая концепция связана с использованием особых свойств солитонных возбуждений на собственных биополимерных цепях, имеющих нониусы, «начиненные» упругими, электронно-колебательными или спиновыми возбуждениями, перемещающимися вместе с нониусом на далекие расстояния (без распада) в область зоны биохимической реакции, где возбуждение безызлучательно распадается на субстрате производя лечебный эффект. Для детальной апробации идеи в качестве солитона была использована модель краудиона Френкеля-Конторовой (1938), но с учетом, во-первых, модифицированной электронной структуры нониуса, во-вторых, его движение вдоль биополимера, в-третьих, его возможной хиральности (спиральности) и, в-четвертых, фрактальности его атомной структуры. Все эти элементы анализа, которые являются составляющими ныне набирающие силу могучей методологии Complexity (Сложность) позволили с различных сторон рассмотреть совокупность характеристик солитонного метода доставки *лечебного состояния* (а не лекарства!) и оценить возможности этой новой стороны наномедицины. Полученные результаты на первой, простейшей, нелинейной, одномерной модели краудиона Френкеля-Конторовой продемонстрировали новые интересные возможности сложных квазичастиц – базового понятия физики конденсированных сред.

Ключевые слова: физика конденсированного состояния, биология, медицина, complexity, доставка лекарств, солитон, краудион Френкеля-Конторовой, безызлучательные переходы, биохимическая реакция.

1. Введение.

Настоящее время характеризуется глубоким взаимовлиянием многих наук друг на друга. Но, в первую очередь, это имеет место между физикой и биомедициной. Все это привело к зарождению и разрастанию такой области, которая получила название биомедицинская физика (БМФ) [1-2]. Под этим названием стали понимать как новые физические методы и аппараты, используемые в БМФ, так и свойства биологических объектов (в норме и патологии), которые измеряются указанной аппаратурой.

Однако такая классификация, родившаяся на границе XX/XXI веков, оказалась к завершению 20-х годов XXI века несколько неадекватной. Было понято, что это оказалось связанным с изменением базовых понятий (парадигм) как в физике конденсированного состояния (ФКС), так и в биологии. Естественно, что изменение основы не могло не задеть (и даже расшатать) «верхние этажи самих зданий» (физики, биологии, медицины), а тем более и «мосты», соединявшие «верхние этажи зданий». Обсудим, что же произошло в XXI веке как с ФКС, так и биологией, и медициной [3-6].

ФКС. Физика конденсированного состояния в последнее время приобрела новое звучание, которое привело к рождению в словаре нового понятия – «СЛОЖНОСТЬ» (COMPLEXITY) [7-8]. Указанная Сложность реализовывалась в новых терминах: «Нано», «Фрактальность», «Системы с низкой размерностью», «Хиральность» и «Синергетика» [9-13]. Если первые четыре понятия указывали на новые свойства объектов, то последнее относилось к новому типу процессов, посредством которых осуществлялись явления, оказывающиеся новыми и парадоксальными. Таким образом, фактически, родились новые научные «Империи»: «Нанотехнологии», «Фрактальное материаловедение», «Синергетическое материаловедение», «Материаловедение систем, находящихся между тремя и двумя измерениями» [14-16]. Однако сюрпризы продолжились уже за счет создания объектов комбинаторного типа: «Нано-фракталы» [15], «Хиральная синергетика» и т.д. [17]. В самое последнее время уже и они стали проявлять тенденции «развивающихся Империй». И это все – касательно Неживой Материи. А что же происходило в Живых системах?

Биология. Биология как наука долгие годы (века) развивалась как система накопительных и описательных знаний, имевших своих героев-адептов [18], которые подразделялись на два типа: одни считали, что для

понимания живой природы достаточно будет знать базовые свойства – неживой, другие же полагали, что в живой природе имеют место свои особые, биотонические законы [19]. Радикальная преференция в сторону первых осуществилась с приходом в биологию понятий «электронов, атомов и молекул», а также крупнейших физиков XX века, в частности: Н. Бора, Шредингера, Гамова, Пригожина, Хакена, Я.И. Френкеля, Е. Вигнера, Ф. Андерсона, Эдвардса, Де-Жена, И.М. Лифшица и др. В результате этого появились новые понятия: «квантовость», «дополнительность», «локализация/делокализация», «самоорганизация», «иерархия», «электронные зонные структуры», «хиральность», «детерминированный хаос» и т.д. Центральным понятием стала «эволюция», которую старались понять в рамках молекулярно-кинетических, синергетических и кибернетических идей. С очень большой вероятностью успеха на сложную парадигму Живого стало претендовать трио: идеи триплетного кода, диссимметрии хиральных структур и отбора с запоминанием (см. В.И. Гольдманский, Г.Р. Иваницкий, В.А. Твердислов) [4,13,17].

Естественно, у определенной части ученых, склонных к крупным обобщениям, возникла идея унификации – Второе Великое Объединение – создание представления о единстве Живого и Неживого. Как же может тогда выглядеть понятие болезни, какая «точка» на пути от Живого к Неживому является границей здоровья и нездоровья? Не есть ли это основа нового взгляда на медицину?

Медицина. Не вызывает сомнения, что именно медицина оказалась одной из самых древних профессией человека. И невероятно сложно, хотя бы частично, охватить единым взглядом ее путь к современному состоянию, знанию и умению. Здесь наиболее поразительным являются сочетание психологического опыта «лекарей» с чрезвычайно быстро нарастающей системой научных представлений ультрасовременного толка, включающего современные идеи физики, химии и математики. Почти обычными кодовыми словами стали понятия «детерминированный хаос», «фрактальность», «теория катастроф», «хиральность», и «иерархия» [20-27]. Именно таково фантастическое проникновение в медицину «фракталов», «синергетики», «идей квазиодномерности», «специфической хиральной дисимметрии», «пульсирующей эволюции», «наноструктур» и т.д. На этой основе уже вполне измеряемых величин пришло осознание, что комбинация медицины и физики, несомненно, в настоящее время реализуется в двух ипостасях: «медицинской физики» и «физической медицины». Остается ли здесь место глубочайшему медицинскому искусству? По всей видимости остается! И это все является основой существования в медицине мульти-парадигматизма. Как же в этой ситуации найти точку опоры ученым, «которые не могут работать без точки опоры»? Такой квазирецепт есть – и он состоит в том, как считают многие, чтобы отнести и современную физику, и современную биологию, и современную медицину к уже упомянутому выше понятию Complexity. А раз так, то дальше следует идти апробированным путем и создавать «азбуку Complexity» (см, напр.[28]), «динамику Complexity» [29], «математику Complexity» [30] и т.д.

2. Концепция применения солитонов в нанобиомедицине.

Исходя из сказанного выше, следует, что при построении моделей новых явлений и эффектов, комбинирующих идеи медицины, биологии и физики, следует исходить из каких-либо конкретных реализаций концепции «Complexity». Это несомненно придаст модели очень большую достоверность. Конкретная цель данной работы состоит в расширении идеологии доставки лекарства (Drug Delivery) [31] за счет того, что вместо доставки конкретного «вещества» (лекарства) мы обсудим возможность доставки определенного требуемого возбужденного «состояния» самой биологической системы, локальные свойства которой будут изменены настолько, чтобы это возбуждение (состояние) сыграло роль лекарства, но оно отнюдь не в виде доставляемого вещества. При этом, мы столкнемся и с необходимостью обсудить **три** последовательных процесса: во-первых, *генерация* этого возбужденного состояния, во-вторых *доставка* требуемого состояния (state) и, в-третьих, чтобы это «состояние», взаимодействуя с субстратом (где должна произойти нужная биохимическая медицинская реакция) сыграло роль нужного *партнера реакции*, либо *катализатора* требуемой реакции. Из всех вариантов – возможности дальней доставки, несомненно, важнейшую роль может играть *солитонное возбуждение* на биополимере, который своим дальним концом простирается в область субстрата. Именно солитонное возбуждение на биополимере обладает уникальным свойством двигаться, не рассеиваясь, не модифицируясь, не распадаясь – классическое свойство солитонов [32,33].

Из двух вариантов солитонных движений наиболее перспективно выбрать решение с *нониусом*, который легко можно возбудить различными способами (химической реакцией на начальном конце биополимера, ультразвуковым, либо световым импульсом [34]). Этот нониус, в зависимости от степени его возбуждения, будет нести различную локальную электронную структуру, отличающуюся от области недеформированного биополимера. Мы полагаем, что имеет смысл выделить три варианта возбужденного нониуса, который будет переносчиком возбуждения вдоль биополимера [33]:

1. При слабой деформации молекулярной цепи происходит небольшое смещение границы запрещенной зоны, причем такое, что при выпуклой деформации энергия потолка валентной зоны он не пересекает уровень Ферми ($|E_F| > |E_V|$), в этом случае локальная область не меняет нейтрального заряда.

2. При больших порциях переданных энергиях нониусу, последний может реализовать возбуждение в двух вариантах, а именно: а) при условии $|E_F| < |E_V|$, но без передачи колебательной энергии нониусу; б) $|E_F| < |E_V|$, но с передачей колебательной энергии нониусу. Таким образом, в случае а) происходит перенос положительного заряда вместе с нониусом, тогда как в случае б) происходит перенос вибронного возбуждения вместе с нониусом (это состояние дырочного солитона).

3. Если вся система находится в постоянном магнитном поле, то происходит перенос нониусом постоянного спина (перенос такого возбуждения является случаем молекулярной спинтроники).

Таковы три интересных случая, каждый из них солитон-подобен, а поэтому устойчив. Важная фаза - достижение нониусом реакционной области (субстрата), где необходимо стимулировать определенную биохимическую реакцию этого субстрата. Варианты реализации подобной стадии весьма разнообразны и обусловлены конкретно необходимой реакцией, идущей по типу безизлучательного перехода [36], но с движущимся нониусом. Эта стадия представляет собой некий аналог многих молекулярных процессов в плазме, когда пролетающая частица успевает (или не успевает) завершить элементарную химическую реакцию [40].

Ниже мы проиллюстрируем схематически предлагаемую трех стадийную схему участия солитона в акте возбуждения биохимической реакции, но при следующих упрощениях: а) в качестве солитон-подобного возбуждения мы используем максимально упрощенный вариант – краудионную модель Френкеля-Конторовой (1938) [37-38,41]; б) в качестве причины возбуждения краудиона мы схематически будем опираться на химический вариант (конкретно, на распад АТФ на АДФ + энергичный атом фосфора) [42]; в) будем полагать, что возбуждение нониуса таково, что он переносит однократный положительный заряд (т.е. дырку) [33]; г) биохимическая реакция с субстратом пролетающего мимо нониуса состоит в перехвате из субстрата электрона на заряженный нониус с его нейтрализацией [36]; д) мы специально обсудим некие усложнения моделей Френкеля-Конторовой, чтобы указать на возможную роль при этом хиральности (спиральности) цепи краудиона [13,17], а также проявление фрактального беспорядка в виде отклонения подложки краудиона от строгой периодичности [10,38]. Таким образом, будет продемонстрирована возможность подпадания анализируемого процесса под «зонтик» концепции Complexity.

3. Краудион Френкеля-Конторовой – первый солитон в физике твердого тела.

Для ясной иллюстрации представляемой схемы использования солитонов в процессе Drug Delivery, мы рассмотрим модель краудиона Френкеля-Конторовой [37,38], являющегося самым первым солитоном в физике твердого тела. Для наших целей, мы дополним ее идеями электронной теории. На рисунке 1 изображена стандартная атомная схема краудиона Френкеля-Конторовой, представляющая собой квазиодномерную цепочку взаимодействующих друг с другом $N + 1$ атомов (по линейному закону) на размещенных в N позициях подложки; последняя действует на $N + 1$ атомов цепочки с помощью синусоидального потенциала. В этом случае для цепочки уравнения движения краудиона имеют вид [37] (рис. 1).

$$m \frac{d^2 z_k}{dt^2} = -2\pi \frac{a}{A} \sin \frac{2\pi z_k}{a} + \alpha (z_{k+1} + z_{k-1} - 2z_k) \quad (1)$$

Здесь m – масса атома краудиона; k – целые числа; α – коэффициент упругого взаимодействия двух соседних атомов в горизонтальном ряду краудиона

Элегантный анализ Френкеля-Конторовой, проведенный более 80 лет назад, позволил в явном виде получить множество интересных деталей [37,38].

В частности, для смещения k -атома получено

$$z_k = \frac{a}{2\pi} \arctg C_0 e^{-\frac{2\pi}{a} \sqrt{-A/m'}(t-k\tau)} \quad (2)$$

Здесь C_0 – константа, отбираемая начальными условиями (напр., при $k \rightarrow 0$, $C_0 = a$); $m' = m - a \cdot \tau^2 < 0$; $\tau = a/V$ – время смещения атома на пробег, равный постоянной решетки a ; V – скорость солитона.

Особенно наглядные результаты могут быть получены при переходе к континуальному пределу [41], что возможно при случае большого превышения размера нониуса над межатомным расстоянием ($\lambda \gg a$). Тогда относительные изменения плотности в краудионе имеют вид:

$$\delta \rho / \rho_0 = -\frac{du}{dx} = \frac{a}{\pi \lambda} \frac{1}{\operatorname{ch}(\frac{x-x_0}{\lambda})}, \quad (3)$$

и они максимальны вблизи центра краудиона - $x \rightarrow x_0$, причем

$$\lambda = \frac{a \cdot S_0 \sqrt{m}}{\pi \tau} \cdot \sqrt{1 - (V/S_0)^2}; \quad (4)$$

V, S_0 – скорость краудиона и скорость звука соответственно.

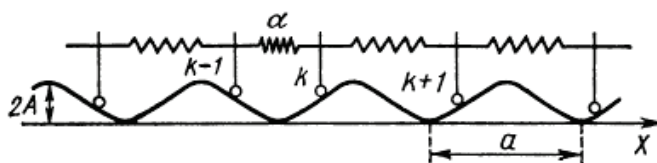


Рисунок 1. Одномерная модель Френкеля-Конторовой

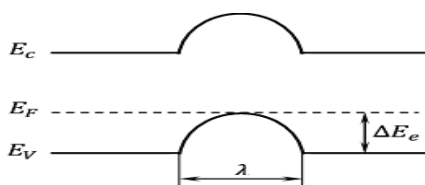


Рисунок 2. Схема электронных состояний краудиона

Минимальная энергия, которая необходима для создания краудиона, определяется как

$$W_{min} = \frac{4}{\pi} \sqrt{m S_0^2 A} \quad (5)$$

Это ограничивает, например, тип химических реакций, способных возбудить краудион (например, распад АТФ на начале цепи).

Из формулы (3), с учетом потенциала деформации Σdef , легко получим величину поднятия электронной энергии, соответствующей потолку валентной зоны, максимальной в центре краудиона (рис. 2).

$$\Delta E_e = \Sigma_{def}(\alpha/\pi\lambda). \quad (6)$$

В результате мы получаем энергетический зазор между уровнем Ферми для всей цепочки E_F и «выпяченным» состоянием потолка валентной зоны в центре нониуса краудиона:

$$E_F - E_c + \Delta E_e = \frac{1}{2} \Delta E_g - \Delta E_e \quad (7)$$

Здесь ΔE_g - ширина электронной щели (запрещенная зона) в идеальной цепи, из которой и образуется краудион. Это позволяет записать вероятность одиночной ионизации (опустошения) электронного состояния в центре нониуса (для не вырожденного случая) в виде:

$$f_+(E_F, \Delta E_e) \approx 1 - \exp \left[-\frac{(\frac{\Delta E_g/2 - \Delta E_e}{2})}{kT} \right] \quad (8)$$

Очевидно, что это положительно заряженное состояние (дырка) на середине нониуса будет перемещаться вдоль цепи, добегая (и пробегая мимо!) субстрата, где ожидается химическая реакция (например, окисления) за счет рекомбинации электрона субстрата с дыркой нониуса.

4. Стадия химической реакции.

В качестве примера химической реакции с участием субстрата и бегущего нониуса рассмотрим следующую реакцию:



где нон и суб означают n и S – нониус и субстрат, соответственно.

Стандартной моделью такого окисления (но без учета движения нониуса) может служить схема безызлучательного перехода, разработанная Коварским [36], схема которого изображена на рисунке 3.

В весьма упрощенном виде вероятность такой реакции обусловлена как величиной матричного элемента перехода ($| \langle i | M | f \rangle |^2$), так и величиной фактора Франка-Кондона ($| \langle \Pi_f | \langle F | I \rangle |^2$), где ($|i\rangle$; $|I\rangle$) и ($|f\rangle$; $|F\rangle$) означают начальные и конечные электронные и фононные состояния.

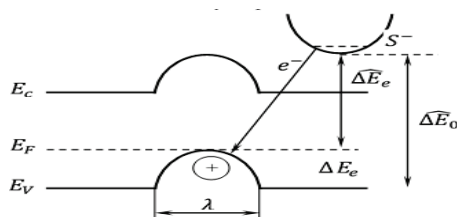


Рисунок 3. Схема электронных переходов при окислительно-восстановительной реакции $n^- + S^- \rightarrow n^0 + S^0$ ($\Delta E_e \approx \Delta \hat{E}_0 - \Delta E_e \sim (1 - \delta\rho/\rho_0)$)

Понятно (см. [36,39]), что вероятность безызлучательного перехода (Ω) возрастает с увеличением «резонантности» начального и конечного состояния, т.е. с уменьшением разности энергии доньев потенциальных ям, что приводит к увеличению фактора Франка-Кондона. Применительно к нашей задаче (см. предыдущий раздел) это означает рост вероятности реакции окисления, когда «вздыбленное» дырочное состояние нониуса приближается снизу к состоянию электронно-колебательного терма субстрата (в этом случае сброс электронной энергии в колебания минимален). Поэтому можно записать условие эффективности реакции окислительного типа Ω (9):

$$\frac{d\Omega}{d(\Delta E_e)} > 0 \quad (10)$$

Что же вносит в физику процесса такой новый элемент как движение нониуса? Очевидно, что это обстоятельство должно учесть время и скорость, входящие в координату нониуса в виде произведения $X_{\text{нон}} = X - V \cdot t$. Этим самым в очень общем виде подобные задачи подпадают «под юрисдикцию» модели Ландау-Зиннера-Штукельберга (см.[40]). Для этого класса моделей очень важным обстоятельством является обратная пропорциональность вероятности Ω скорости сближающихся и разлетающихся компонентов реакции, т.е. $\Omega \sim 1/V$. В нашем же случае, поскольку от скорости зависит и ширина нониуса [37], т.е. и «вздыбленность» потолка валентной зоны, то мы получим $\frac{d(\Omega)}{dV} \sim \frac{d(V)}{dV}/V$, где $\frac{d(V)}{dV} > 0$, тогда как $\frac{d(1/V)}{dV} < 0$. Более детальный анализ зависимости $\Omega(V)$, но уже в рамках классической задачи о перезарядке в плазме (задача Фирсова см.[40]), действительно, дает для $\Omega(V)$ кривую с максимумом, т.е. максимум эффективности редокс-процессов с участием солитонов (краудионов) лежит в промежуточной области скоростей солитона, что обязательно должно быть учтено и в будущем как характерная особенность изучаемого процесса.

5. Проблема хиральности молекулярной цепи

Учет роли хиральности в модели Френкеля-Конторовой в строгом смысле слова невозможен, поскольку сама модель строго одномерна, но используя некие ухищрения, исходящие из свойств солитона Давыдова [42], можно в качественном виде обсудить влияние хиральности на вероятность Ω . Суть этой идеи состоит в том, что линии термов на рисунке 4, характерные для модифицированной модели Френкеля-Конторовой, в модели солитона Давыдова должны заменяться зонами разрешенных энергии, возникающих из-за учета периодичности как связывающих, так и разрывающих электронных состояний.

Учет этого расширения электронных состояний дополнительно поднимает уровень потолка валентной зоны в центре нониуса и опускает дно уровня зоны проводимости в том же центре нониуса. Как результат получается некоторое увеличение ΔE_e , что увеличивает вероятность образования положительной дырки в центре нониуса и уменьшает энергетическое расстояние между дном терма субстрата и указанного заряженного состояния нониуса. Оба этих обстоятельства, перемножаясь, входят таким образом в вероятность химической реакции и увеличивают величину Ω . Однако, с увеличением хирального угла указанные процессы уменьшаются, отражая тем самым уменьшение перекрывания электронных орбиталей соседних мономеров (трудно оспоримый и весьма удивительный результат).

3. Проявление фрактальности структуры биополимера в солитонном (краудионном) переносе «состояния» для стимулирования биохимической реакции.

Частичное неупорядочение структур в биополимере, в частности в нуклеиновых кислотах и белках [43] вне всякого сомнения должно проявиться и быть учтено, в моделях солитона различных типов. В настоящее время прохождению солитона сквозь неупорядоченные среды посвящено большое количество исследований, особенно математического плана [44]. Роль же неупорядоченности среды или самого биополимера в модели Френкеля-Конторовой явно недостаточно. Поскольку мы для особой наглядности при построении модели выбрали именно простейший солитон – именно краудион Френкеля-Конторовой, то ниже мы произведем небольшое обобщение результатов Френкеля-Конторовой (1938), которое позволит нам увидеть, в какой степени неупорядоченность среды понижает длину пробега краудиона, ограничивая тем самым возможность «достать» зону биохимической

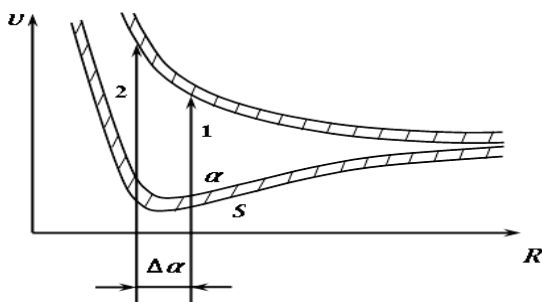


Рисунок 4. Схема энергетических термов мономера для идеальной структуры цепи (1) и цепочки с нониуса (2) (модельная система, $R_{ab} = 0,8$ Ангстрем; теплота диссоциации $3,14\text{eV}$)

реакции внутри биологического объекта. Если вернуться к краудионной модели Френкеля-Конторовой, то обсуждаемая неупорядоченность, скорее всего, может быть моделирована неодинаковостью потенциального рельефа подложки, вдоль которой бежит краудион. Эта неупорядоченность может быть двух типов: разброс как высот потенциальных барьеров $A \rightarrow \{A_j\}$, так и ширины $a \rightarrow \{a_j\}$ (интересно отметить, что первый вариант в «большой науки о неупорядоченности» [45] соответствует модели Ф.Андерсона и жидкостной модели Фриша, соответственно. Представляется, что оба этих варианта могут быть в некоторой степени объединены в модель набора частот колебаний атомов подложки, т.е. $\omega \rightarrow \{\omega_j\}$. Теперь, возвращаясь к работе Френкеля и Конторовой, где торможение краудиона осуществлялось за счет отбора энергии у пробегающего нониуса колебаниями *одинаковых* атомных осцилляторов подложки, мы можем записать следующие выражения:

$$\delta W = \frac{2}{m} \left| \int_{t_1}^{t_2} F(t) e^{i\omega_0 t} dt \right|^2 \rightarrow \frac{8\pi^2}{ma^2} A^2 T^4 \sum_p \frac{(\omega_p^0)^2}{ch^2 \left(\frac{\pi \omega_p^0 T}{2} \right) [\omega_p^0]^\delta} = \delta \hat{W} \quad (11)$$

Здесь важнейший шаг состоит в том, что распределение по частотам колебаний атомов подложки $\{\omega_p^0\} \rightarrow \frac{const}{(\omega_0)^\delta/2}$ мы выбрали фрактальным, столь характерным именно для биологических объектов [21], а δ – некоторое число (фрактальная размерность). Вычисление последнего интеграла (11) методом перевала показывает, что $\delta \hat{W} / \delta W > 1$ и зависит от величины фрактальной размерности: $\frac{d}{d\delta} \left\{ \frac{\delta \hat{W}}{\delta W} \right\} < 0$.

Поскольку длина пробега солитона (краудиона) определяется как $X^{max} = \frac{a}{\delta W} \cdot W$, то очевидно следующее: $\frac{X_{фракт}^{max}}{X_{идеал}^{max}} < 1$, т.е. пробег краудионов во фрактальной среде всегда меньше, чем в идеальной. Это означает, что обязательно необходимо учитывать глубину залегания зоны реакции ($L_{реакции}$), поскольку при $X_{фракт}^{max} < L_{реакции}$, реакции, стимулированные солитонами, не возможны.

4. Заключение и выводы.

Использование солитонов, например, краудионов (в модели Френкеля-Конторовой) показывает следующее:

1. Принципиально возможно расширение понятия «доставка лекарства и его применение в зоне реакции» на основе «солитонных возбуждений молекулярных цепей», реализуемых при выполнении ряда условий.
2. Эти условия включают: а) эффективный механизм генерации солитона (краудиона) на биополимере; б) создание требуемого электронно-колебательного возбуждения, локализованного на нониусе; в) эффективный безызлучательный переход между нониусом, «начиненным возбуждением» на достижимой солитоном глубине пробега;
3. Все атрибуты идеологии Complexity реализуемы и существенны в биополимерных цепях; для данной задачи – это «квазиодномерность», «фрактальность», «хиральность» и «нанозалегание», причем все они оказались важными для эффективной солитонной доставки состояния и эффективной биохимической реакции.
4. Относительно эффективности третьей стадии биохимической реакции с участием солитона необходимо иметь в виду, что она связана с начальной скоростью солитона, т.е. запасом его исходной энергии при генерации.
5. Каждый солитон может участвовать в обсуждаемом процессе стимуляции не тратясь, т.е. многократно.
6. Расширение предложенного анализа за счет изучения роли солитонов Давыдова (вместо простейшего краудиона Френкеля-Конторовой), несомненно, приблизит предлагаемую теоретическую схему солитонной медицины к реальным ситуациям и откроет много новых возможностей.
7. С точки зрения общего подхода физики конденсированного состояния, где базовым понятием являются квазичастицы [46], обнаружение нового аспекта применения такой классической квазичастицы как краудион Френкеля-Конторовой, не может не вызывать у теоретиков определенного удовлетворения.

В заключении авторы хотели бы выразить свою глубокую благодарность за обсуждение возможной роли солитонов в наномедицине известным специалистам в области медицинской физики профессору Р. Летфуллину и доктору Н. Тураевой (США), а также многим своим коллегам – физикам, биологам и медикам в Узбекистане.

Список литературы / References:

1. Лещенко В.Г., Ильич Г.К. *Медицинская и биологическая физика*. Минск: Новое знание, ИНФРА-М, 2012, 552 с. [Leshchenko V.G., Ilyich G.K. *Medical and Biological Physics*. Minsk: New Knowledge, INFRA-M, 2012, 552 p. (In Russ.)]
2. Wood A.W. *Physiology, Biophysics, and Biomedical Engineering*. CRC Press, 2012, 784 p.
3. Marder M.P. *Condensed Matter Physics*. John Wiley & Sons, 2010, 984 p.
4. Иваницкий Г.Р. XXI век: Что такое жизнь с точки зрения физики. *УФН*, 2010, т. 180, № 4, с. 337-369. DOI: 10.3367/UFNr.0180.201004a.033 7.
5. Mackey M., Glass L. *From Clocks to Chaos: The Rhythms of Life*. : Princeton University Press, 1988, 272 p.
6. Havlin S., Buldyrev S.V., Goldberger A.L., Stanley H.E. et al. Fractals in Biology and Medicine. *Chaos. Solitons & Fractals*, 1995, vol. 6, pp. 171-201. DOI: 10.1016/0960-0779(95)80025-C.
7. Sherrington D. Physics and complexity. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 2010, vol. 368, pp. 1175-1189. DOI: 10.1098/rsta.2009.0208.

8. Bonchev D., Seitz W. The Concept of Complexity in Chemistry. Chapter in book: *Concepts in Chemistry: A Contemporary Challenge*. Editor Rouvray D. H., Wiley, 1997, pp. 353-381.
9. Суздальев И.П. *Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов*. Ком Книга, 2006, 592 с. [Suzdalev I.P. *Nanotechnology: physical chemistry of nanoclusters, nanostructures and nanomaterials*. Kom Kniga, 2006, 592 p. (In Russ.)]
10. Федер Е. *Фракталы*. пер. с англ. М.: УРСС, Ленанд, 2014, 256 с. [Feder E. *Fractals*. М.: URSS, Lenand, 2014, 256 p. (In Russ.)]
11. *Physics of Low Dimensional Systems*. Editor Morán-López: Springer, 2001, 492 p.
12. Олемской А.И., Кацнельсон А.А. *Синергетика конденсированной среды*. М.: Едиториал УРСС, 2003, 336 с. [Olemskoy A.I., Katsnelson A.A. *Synergetics of Condensed Matter*. М.: Editorial URSS, 2003, 336 p. (In Russ.)]
13. Твердислов В.А., Малышко Е.В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы. *УФН*, 2019, т. 189, № 4, с. 375-385. DOI: 10.3367/UFNr.2018.08.038401.
14. Oksengendler B.L., Turaeva N., Ashirmetov A., Ashurov Kh.B. Nanofractals, Their Properties and Applications. In book: *Horizons in World Physics*.: Nova Science Publishers, 2019, vol. 298, pp. 1-41.
15. Иванова В.С., Баланкин А.С., Бунин И.Ж., Оксогоев А.А. *Синергетика и фракталы в материаловедении*. М.: Наука, 1994, 383 с. [Ivanova V.S., Balankin A.S., Bunin I.Zh., Oksogoev A.A. *Synergetics and fractals in materials science*. Moscow: Nauka, 1994, 383 p. (In Russ.)]
16. Dash J.G. Between Two and Three Dimensions. *Physics Today*, 1985, vol. 38, no. 12, pp. 26-35. DOI: 10.1063/1.880994.
17. Гольдманский В.И., Кузьмин В.В. Спонтанное нарушение зеркальной симметрии в природе и происхождение жизни. *УФН*, 1989, т. 157, с. 3-50. DOI: 10.3367/UFNr.0157.198901a.0003.
18. Вилли К., Детье В. *Биология, Биологические процессы и законы*. Москва: Мир, 1974, 821 с. [Willie K., Child V. *Biology, Biological processes and laws*. Moscow: Mir, 1974, 821 p. (In Russ.)]
19. Волькенштейн М.В. *Общая биофизика*. М.: Наука, 1978, 592 с. [Volkenstein M.V. *General biophysics*. М.: Nauka, 1978, 592 p. (In Russ.)]
20. Пригожин И., Стенгерс И. *Порядок из хаоса. Новый диалог человека с природой*. М.: Прогресс, 1986, 432 с. [Prigogine I., Stengers I. *Order from chaos. A New Dialogue between Man and Nature*. М.: Progress, 1986, 432 p. (In Russ.)]
21. Liebovitch L.S. *Fractals and Chaos Simplified for the Life Sciences*.: Oxford University Press; 1998, 288 p.
22. Dinicola S., D'Anselmi F., Pasqualato A. et.al. A Systems Biology Approach to Cancer: Fractals, Attractors, and Nonlinear Dynamics. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 2011, pp. 1-12. DOI: 10.1089/omi.2010.0091.
23. Гилмор Р. *Прикладная теория катастроф*. М.: Мир, 1981, т. 1, 344 с. [Gilmore R. *Applied catastrophe theory*. М.: Mir, 1981, vol. 1, 344 p. (In Russ.)]
24. Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Жаворонков А.А. Хиральность как проблема биохимической физики. *Рос.хим.ж.*, 2007, т. 51, № 1, с. 13-22. [Tverdislov V.A., YAkovenko L.V., ZHavoronkov A.A. Hiral'nost' kak problema biohimicheskoy fiziki. *Ros. him. zh.*, 2007, vol. 51, no. 1, pp. 13-22. (In Russ.)]
25. Li Peng, Yu Lei, Yang Jingyun, Lo et.al. Interaction between the progression of Alzheimer's disease and fractal degradation. *Neurobiology of Aging*, 2019, vol. 83, pp. 21-30. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.08.023.
26. Oksengendler B.L., Ivanov N.V., Ashirmetov A.Kh., Im V.K., Maksimov S.E. Study of dynamics of some human diseases on the base of fractal approach ("range" method). *Open J Cardiol Heart Dis.*, 2017, vol. 1, no. 1. OJCHD.000504. DOI: 10.31031/OJCHD.2017.01.000504.
27. Letfullin R.R., George T.F. *Computational Nanomedicine and Nanotechnology: Lectures with Computer Practicums*. Switzerland: Springer, 2016, 306 p.
28. Николис Г., Пригожин И. *Познание сложного*. М.: Мир, 1990, 344 с. [Nicolis G., Prigogine I. *Cognition of the complex*. М.: Mir, 1990, 344 p. (In Russ.)]
29. Николис Дж. *Динамика иерархических систем: Эволюционное представление*. М.: Мир, 1989, 488 с. [Nicolis J. *Dynamics of Hierarchical Systems: Evolutionary Representation*. Moscow: Mir, 1989, 488 p. (In Russ.)]
30. *Mathematics of Complexity and Dynamical Systems*. Editor Meyers R.A., New York: Springer-Verlag, 2011, 1858 p.
31. Maiti S., Kumar S.K. *Introductory Chapter: Drug Delivery Concept*.: Intech Open, 2017, pp. 1-12.
32. Давыдов А.С. Солитоны в квазиодномерных молекулярных структурах. *УФН*, 1982, т. 138, с. 603-643. DOI: 10.3367/UFNr.0138.198212c.0603. [Davydov A.S. Solitony v kvaziodnomernykh molekulyarnykh strukturah. *UFN*, 1982, vol. 138, pp. 603-643. (In Russ.)]
33. Heeger A.J., Pethig R. Charge Storage and Charge Transport in Conducting Polymers: Solitons, Polarons and Bipolarons. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 1985, vol. 314, no. 1528, pp. 17-35. DOI: 10.1098/rsta.1985.0005.
34. Pelinovskii E.N., Slyunyaev A.V. Generation and interaction of large-amplitude solitons. *Journal of Experimental and Theoretical Physics*, 1998, vol. 67, no. 9, pp. 628-633.
35. Pascual P.J., Vázquez L. Sine-Gordon solitons under weak stochastic perturbations. *Phys. Rev.B*, 1985, vol. 32, p. 8305. DOI: 10.1103/PhysRevB.32.8305.

36. Коварский В.А. Квантовые процессы в биологических молекулах. Ферментативный катализ. *УФН*, 1999, т. 169, № 8, с. 889-908. [Kovarskij V.A. Kvantovye processy v biologicheskikh molekulah. Fermentativnyj kataliz. *UFN*, 1999, vol. 169, no. 8, pp. 889-908. (In Russ.)]
37. Френкель Я.И. *Введение в теорию металлов*. М.: Физматгиз, 1958, 368 с. [Frenkel Ya.I. *Introduction to the theory of metal*. Moscow: Fizmatgiz, 1958, 368 p. (In Russ.)]
38. Браун О.М., Кишварь Ю.С. *Модель Френкеля – Конторовой, Концепции, Методы, Приложения*. Физматлит, 2008, 536 с. [Braun O.M., Kishvar' YU.S. *Model' Frenkelya – Kontorovoj, Konceptii, Metody, Prilozheniya*. Fizmatlit, 2008, 536 p. (In Russ.)]
39. Медведев Э.С., Ошеров В.И. *Теория безызлучательных переходов в многоатомных молекулах*. Москва: Наука, 1983, 280 с. [Medvedev E.S., Oshero V.I. *Theory of nonradiative transitions in polyatomic molecules*. Moscow: Nauka, 1983, 280 p. (In Russ.)]
40. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Теоретическая физика в 10 томах. Квантовая механика (нерелятивистская теория)*. М.: Наука, 1989, т. 3, 768 с. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Theoretical physics in 10 volumes. Quantum mechanics (nonrelativistic theory)*. Moscow: Nauka, 1989, vol. 3, 768 p. (In Russ.)]
41. Косевич А.М. *Физическая механика реальных кристаллов*. Киев: Наукова Думка, 1981, 328 с. [Kosevich A.M. *Physical mechanics of real crystals*. Kiev: Naukova Dumka, 1981, 328 p. (In Russ.)]
42. Давыдов А.С. *Биология и квантовая механика*. Киев: Наукова думка, 1979, 296 с. [Davydov A.S. *Biology and Quantum Mechanics*. Kiev: Naukova Dumka, 1979, 296 p. (In Russ.)]
43. Peng C.-K., Boldyrev S.V., Havlin S., Simons M., Stanley H.E., Goldberger A.L. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Phys. Rev.*, 1994, vol. 49, pp. 1685-1689. DOI: 10.1103/PhysRevE.49.1685.
44. Abdullaev F. Optical solitons in random media. Chapter 2 in *Progress in Optics* vol.48, Editor E. Wolf: Elsevier, 2005, pp. 1-55. DOI: 10.1016/S0079-6638(05)48002-6.
45. Займан Дж. *Модели беспорядка. Теоретическая физика однородно неупорядоченных систем*. М.: Мир, 1982, 592 с. [Ziman J. *Models of disorder. Theoretical physics of uniformly disordered systems*. М.: Mir, 1982, 592 p. (In Russ.)]
46. Брандт Н.Б., Кульбачинский В.А. *Квазичастицы в физике конденсированного состояния*. М.: Физматлит, 2005, 632 с. [Brandt N.B., Kulbachinsky V.A. *Quasiparticles in Condensed Matter Physics*. Moscow: Fizmatlit, 2005, 632 p. (In Russ.)]

SOLITON EXCITATION DELIVERY AND STIMULATION OF BIOCHEMICAL REACTIONS FOR MEDICAL PURPOSES IN LIVING SYSTEMS

Ashirmetov A.Kh.¹, Iskandarova F.², Nikiforova N.N.³, Oksengendler B.L.^{3,4}

¹ Institute of Hematology, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan
Chilanzar-6, 42A, Tashkent, 100185, Uzbekistan

² Center for the Prevention of Plague, Quarantine and Especially Dangerous Infections, Ferghana branch
59 Yangi Fargona str., Yangi Margilon city 150113, Uzbekistan

³ Institute of Ion-Plasma and Laser Technologies Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan
33 Durmon yuli st., Tashkent, 100125, Uzbekistan

⁴ Institute of Chemistry and Physics of Polymers, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan
Tashkent, A.Kadiri st., 7B, 100128, Uzbekistan; e-mail: oksengendlerbl@yandex.ru

Abstract. The article examines the actual problem of drug delivery on a fundamentally new basis. In contrast to the idea of using nanoparticles of the "core shell" type, where core is a healing substance, and shell is an organic coating that overcomes physiological barriers, the new concept is associated with the use of special properties of soliton excitation on biopolymer own chains, which have verniers "stuffed" with elastic, electronic vibrational or spin excitations moving along with the vernier over long distances (without decay) to the region of the biochemical reaction zone, where the excitation decays nonradiatively on the substrate producing a therapeutic effect. For detailed approbation of the idea, the Frenkel-Kontorova crowdion model (1938) was used as a soliton, but taking into account, first, the modified electronic structure of the vernier, second, its motion along the biopolymer, and third, its possible chirality (helicity) and fourthly, the fractality of its atomic structure. All these elements of analysis, which are components of the now gaining strength of the powerful Complexity methodology, made it possible to examine from various angles the totality of characteristics of the soliton method of delivering a therapeutic state (and not a drug!) And assess the possibilities of this new side of nanomedicine. The results obtained on the first, simplest, nonlinear, one-dimensional model of the Frenkel-Kontorova crowdion demonstrated new interesting possibilities of complex quasiparticles - the basic concept of condensed matter physics.

Key words: condensed matter physics, biology, medicine, complexity, drug delivery, soliton, Frenkel-Kontorova crowdion, nonradiative transitions, biochemical reaction.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ ИНОЗИН ТРИФОСФАТ ПИРОФОСФОГИДРОЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА P32T-ITPA И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ ФЕРМЕНТА

Колтовая Н.А.

Объединенный институт ядерных исследований,
ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: koltovaya@jinr.ru
Поступила в редакцию: 24.07.20

Аннотация. Аналоги оснований относятся к мощным антиметаболитам и опасным мутагенам, образующимся эндогенно в условиях окислительного стресса, воспаления и aberrантного синтеза нуклеотидов. Инозин трифосфатпирофосфогидролаза человека (ITPA) гидролизует трифосфаты неканонических пуриновых оснований (ИТФ, дИТФ, ХТФ, дХТФ) и, таким образом, регулирует пул нуклеотидов и защищает клетки от повреждений ДНК. Полиморфная аллель с.94C>A, характеризующаяся заменой P32T, приводит к утрате ферментативной активности в эритроцитах и накоплению ИТФ. Мутантная аллель P32T-ITPA ассоциирует с неблагоприятной реакцией на пуриновые аналоги, используемые в качестве препаратов при трансплантации органов, лечении рака крови и воспалительных заболеваний кишечника. Механизм инактивации мутантной формы P32T-ITPA не известен. Моделирование мутантной формы фосфогидролазы показало, что происходит ослабление связи между двумя субъединицами [1]. Действительно, согласно экспериментальным данным мутантный фермент менее стабилен, но активен *in vitro* [2]. Выдвинутая в литературе гипотеза о выталкивании гидрофобного остатка наружу, что служит сигналом для деградации белка [3], при моделировании мутантного фермента не подтвердилась [1]. Для понимания механизма инактивации *in vivo* необходимо более детальное рассмотрение молекулярных механизмов экспрессии гена. В процессе транскрипции гена происходит альтернативный сплайсинг и образование трех вариантов, причем в разных тканях пропорции этих вариантов разнятся. При белковом электрофорезе наблюдаются множественные полосы [4]. В данной работе, используя программы, определяющие потенциальные сайты химических модификаций, удалось определить сайты фосфорилирования, убиквитинирования и сумоилирования. Предполагается, что химические модификации участвуют в регуляции локализации белка и его активности. Полученные результаты позволяют планировать дальнейшую экспериментальную проверку наличия модифицированных форм и моделирование влияния химических модификаций на активность фермента.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм гена ITPA, аллельная форма инозин трифосфатпирофосфогидролаза P32T-ITPA, компьютерное моделирование, потенциальные сайты химических модификаций.

Эволюционно-консервативная инозин трифосфатпирофосфогидролаза ИТФаза (кодируемая геном ITPA) относится к протекторным ферментам, которые удаляют неканонические (д)ИТФ (дезоксинуклеозид трифосфаты такие как (д)ИТФ из пула (д)ИТФ. Неканонические пурины возникают спонтанно при дезаминировании аденина или гуанина, а также являются предшественниками синтеза АМФ и ГМФ. Таким образом, ИТФаза регулирует внутриклеточный пул АТФ через предшественника ИТФ [5]. ИТФаза экспрессируется во всех тканях человека [6]. Результаты нозерн-блот и микрочипового анализа показали, что экспрессия наиболее активно происходит в клетках сердца, печени, щитовидной железы и тимуса. Исследования на клетках бактерий, дрожжей и человека выявили, что дефектность по фосфатазе приводит к повышению чувствительности к неканоническим пуринам, возрастанию скорости возникновения мутаций, замедлению прохождения клеточного цикла, возникновению повреждений ДНК и хромосомных aberrаций, увеличению апоптоза и повреждениям митохондриальной ДНК [7-13]. Последнее предполагает, что несбалансированность нуклеотидов может изменять митохондриальные функции. Как следствие, ИТФаза является важным протектором гомеостаза в клетках, снижает возникновение генетической нестабильности, рака, старения и целый ряд заболеваний у людей.

Полиморфизм гена ITPA ассоциирует с изменениями активности фосфатазы. Почти у трети популяции человека уровень активности ITPA снижен [4-16]. Так для двух аллелей в гетерозиготном состоянии наблюдается снижение активности фермента до 60 % и 22 %. Клетки эритроцитов гомозиготные по мутации ITPA с.94C>A имели нулевую ферментативную активность и 25 %-ную у гетерозигот [17]. Эта аллель наиболее часто встречается в Азии (11-15%), и наименее редко в Центральной и Южной Америке (1-2%), со средней частотой на Кавказе и в Африке (6-7%) [18]. У человека в гене ITPA идентифицировано, по крайней мере, тридцать полиморфизмов [19], из них семь имеют клинические проявления. Было показано, что мутации ITPA вызывают раннюю юношескую энцефалопатию и вариации связаны с ранней восприимчивостью к туберкулезу. За последнюю декаду была установлена фармакологическая значимость вариантов ITPA [19]. Многочисленные статьи демонстрируют, что статус ITPA влияет на результаты лечения гепатита С и тиопуриновую терапию [20].

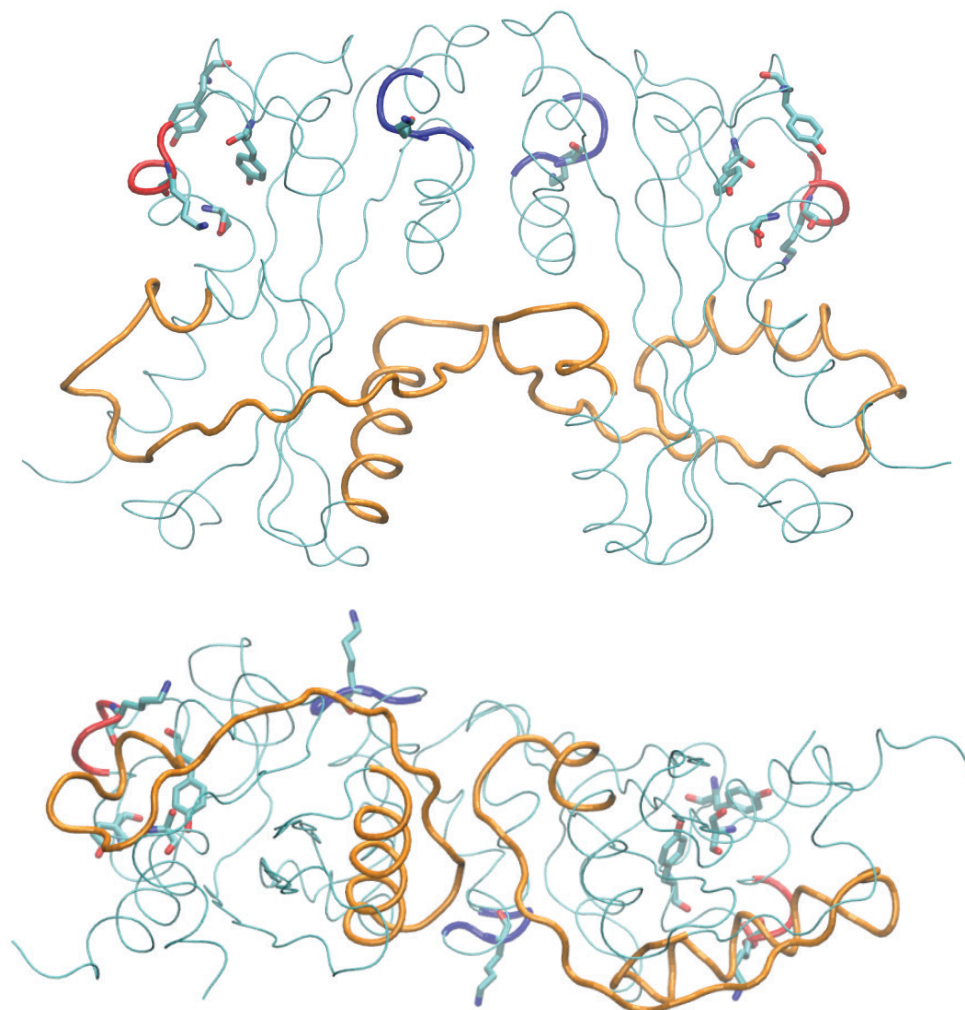


Рисунок 1. 20-нс структура димера Itpa дикого типа, полученная в результате симуляции на базе кристаллической структуры PDB: 2J4E [1]. Обозначены: делеция E2+E3 (золотой); потенциально убиквитинируемый консенсус (красный) и модифицируемый лизин (K171); сумоилируемый консенсус (синий) и модифицируемые лизины K108, K171; фосфорилируемые остатки (T36, Y162, Y166, S178)

Применение тиопурина может быть токсичным для пациентов с полиморфизмом *ITPA*, в то же время полиморфизм *ITPA* ассоциирует с улучшением результатов у пациентов принимавших рибавирин. Потенциально статус *ITPA* может оказывать влияние на большое число пациентов, и следовательно, контроль и моделирование активности ИТФазы перспективны для снижения негативных последствий для *ITPA* ассоциируемых заболеваний.

Белок. Ген *ITPA* кодирует белок размером 194 аа и массой 21,5 кДа, функционирующий в цитоплазме в виде гомодимера (45 кДа). Анализ кристаллической структуры [21, 22] показал, что мономер состоит из двух кулачков (рис. 1), в щели между которыми располагается сайт связывания нуклеотида. Субъединицы димера удерживаются вместе за счет водородных связей между кулачками.

При кристаллизации мутантного Р32Т-белка наблюдалось выдавливание N-концом соседнего остатка F31 [3]. На основании этого факта авторы предложили гипотезу протеасомной деградации мутантного белка, узнаваемого по выворачиванию гидрофобного остатка. Однако моделирование мутантного белка не подтвердило выворачивание остатка F31 [1], но подтвердило ослабление связи между субъединицами у мутантного димера.

Транскрипция. Инозинтрифосфатпирофосфогидролаза человека кодируется геном *ITPA* (*Inosine Triphosphate Pirophosphohydrolase*). Ген *ITPA* (GenBank AF026816) локализован в коротком плече хромосомы 20 (20p13). Размер гена 13,9 тпн, суммарная длина восьми экзонов составляет 585 пн [23]. В результате альтернативного сплайсинга помимо полной мРНК, обнаруживаются два укороченных варианта, у которых отсутствует либо 2 и 3 экзоны ($\Delta 123$ н), либо только 3 экзон ($\Delta 65$ н) [24]. Для транскрипции характерна тканеспецифичность. Например, в лейкоцитах периферической крови транскрипты гена *ITPA* распределяются по длине следующим образом – 70 % полная мРНК, 25 % короткая и 5 % средняя; в ретикулоцитах – 92 %, 8 %, 0 %, а в клетках фибробластов – 94 %, 1 % и 5 %, соответственно. В то же время, в клетках HeLa превалирует средний вариант [12]. Отметим, что для эукариот характерен альтернативный сплайсинг. Около 74 % генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу. Кроме того, 15 % точечных мутаций, ассоциированных с заболеваниями человека, приводят к ошибочному сплайсингу пре-мРНК [25]. В эукариотических клетках альтернативный сплайсинг пре-мРНК обеспечивает регуляцию экспрессии генов и образование широкого спектра изоформ, влияющих на активность и локализацию белка в клетке.

Активность. Хотя снижение уровня полного транскрипта пре-мРНК у мутанта может частично объяснить снижение активности фермента, но для полной инактивации этого недостаточно. В настоящее время биохимия ИТФазы и ее специфическая роль в метаболизме пуринов недостаточно изучены. Хотя некоторое понимание достигнуто в отношении субстратной селективности, однако неизвестно существуют ли белок-связывающие партнеры, модифицируется ли фермент пост-трансляционно, есть ли аллостерическая регуляция. Кроме того, роль ингибирования субстратом в клетке неизвестна, может ли оно служить для модулирования внутриклеточной концентрации ИТФ, ИМФ и даже инозина. Это предположение косвенно подтверждается расхождением данных, полученных в работах с очищенной/рекомбинантной ИТФазой и полными клеточными лизатами. Например, Бэккер с соавторами нашел, что ИТФаза не является объектом ингибирования субстратом, в экспериментах они использовали клеточный экстракт эритроцита в качестве источника белка [26], в то время как исследования, использующие очищенный/рекомбинантный белок ИТФазы в качестве источника белка, показали ингибирование субстратом [5, 6, 27]. Эти результаты указывают, что уровень ингибирования субстратом для ИТФазы может модулироваться *in vivo*.

Из четырех SNP клинически значимых мутаций две влияют на структуру белка и два аллельных варианта гена *ITPA* ассоциируются со снижением ферментативной активности: *ITPA* с.94C>A и *ITPA* g.IVS2+21A>C [23]. Первая из них локализована в экзоне 2, вторая – в интроне 2. Наиболее изучена экзонная мутация с.94C>A (p.Pro32Thr), локализуется она в регуляторном элементе ESE (*exonic splicing enhancer*). Однуклеотидная замена с.94C>A влияет на спектр транскриптов. Этот вариант изменяет сплайсинг мРНК, в результате мисс-сплайсинга вырезаются 2 и 3 экзоны и предположительно синтезируется неактивный белок. Хотя ошибочный сплайсинг происходит с некоторой частотой и в клетках дикого типа, уровень ошибочного сплайсинга возрастает в три раза для гомозиготных вариантов. У эритроцитов количество длинных вариантов падает до 33 %, а короткого – возрастает до 69 % [24]. Кроме того, показано, что в результате замены Pro32Thr образуется белок с почти в два раза сниженной каталитической активностью и стабильностью [2, 3, 28]. Эта позиция в полипептидной цепи локализована во внешней петле, соседней белок-димерному интерфейсу, и близко к остаткам, которые участвуют в катализе [21, 22]. Пролин в этом положении, по-видимому, ограничивает подвижность внешней полипептидной цепи, которая снижает способность раствора проникать внутрь белка и обеспечивает поддержание соответствующих позиции каталитическим остаткам [3, 28]. Точечная мутация P32T, по-видимому, влияет на белок тремя способами: снижает экспрессию полного транскрипта, снижает каталитическую активность и снижает стабильность [2, 3, 24, 28]. Иными словами, однуклеотидный полиморфизм (SNP) приводит к слабой экспрессии нестабильного, каталитически компромиссного белка.

Трансляция. Для получения чистого белка полную версию кДНК дикого (P32) или мутантного (T32) типов встраивали в плазмиду и трансформировали в бактериальные клетки. Выделенный и очищенный белок разгоняли с помощью ЭФ в полиакриламидном геле с SDS, затем гели окрашивали Кумасси [2, 6]. Другие авторы разгоняли лизат клеток, а белок локализовали с помощью Вестерн блот-гибридизации [4]. При ЭФ очищенного белка обычно наблюдается одна полоса, соответствующая белку ~23 кДа, но при перегрузе появляется вторая полоса ~60 кДа. Первая, по-видимому, соответствует мономеру, а вторая – димеру. При ЭФ с SDS почти все димерные формы распадаются, так как происходит разрыв водородных связей.

Укороченный белок (~16,5 кДа) не виден на приведенных ЭФ, возможно из-за урезания авторами электрофореграмм. Его образование не исключено, поскольку сайты связывания между субъединицами в верхнем кулачке сохранились. Но его функциональность скорее всего нарушена, поскольку дилетированный фрагмент участвует в связывании нуклеотида. Промежуточный белок abortивный, так как в результате вырезания экзона 3 происходит сдвиг рамки считывания. Поэтому в клетках HeLa, в которых преобладает мРНК среднего размера, по-видимому, будет наблюдаться сильное снижение активности.

Вестерн блот-гибридизация лизатов клеток человека (фибробласты человека, эпителиальные колоректальные раковые клетки), несущих дикий и мутантный аллели, показал наличие четырех ярких и нескольких слабых полос (рис. 2).

Не исключено, что множественность полос связана с неспецифичностью антител. Однако, можно предположить, что наблюдаются реально существующие химически модифицированные формы ИТФазы.

Пост-трансляционная химическая модификация. Для поиска сайтов химической модификации использовали несколько программ. Эти программы оперируют понятием «предсказательная оценка» консервативности консенсуса (score). Эта величина лежит в области 0,000-1,000. Оценка $s > 0,500$ показывает положительное предсказание. Анализ аминокислотной последовательности белка:

GSMAASLVGKKIVFVTGNAKKLEEIVVQILGDKFPCTLV AQKIDLPEYQGEPEDEISIQKCQEAVRQVQGPVLV
EDTCLCFNALGGLPGPYIKWFLEK LKPEGLHQLLAGFEDKSAYALCTFALSTGDPSPQVRLFRGRTSGRIVAPR
GCQDFGWDPCFQPDGYEQTYAEMPKAEKNAVSHRFRALLELQEYFGSLAA

выявил потенциальные консенсусы модификации убиквитином, SUMO и фосфатом (0,5 кДа) (табл. 1). При убиквитинировании к лизину белка-субстрата присоединяется через глицин 76 одна (моноубиквитинирование) или несколько (полиубиквитинирование) молекул убиквитина (8,5 кДа). Белки SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier proteins*) подобны убиквитину и представляют семейство малых убиквитин-подобных белков. При

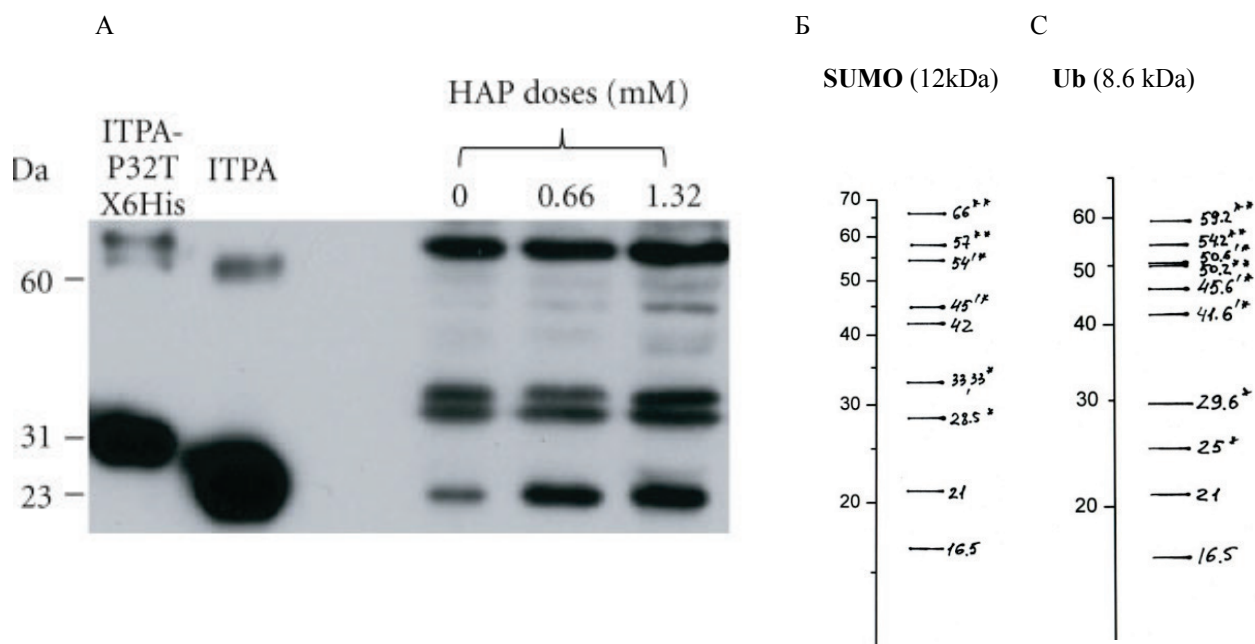


Рисунок 2. А) Белковая электрофореграмма лизата клеток НСТ116. Уровень Itpa [4]. Б) Теоретически ожидаемые размеры комбинации моносумоилированных и немодифицированных субъединиц (димеры и мономеры). С) Теоретически ожидаемые размеры комбинации моноубиквитинированных и немодифицированных субъединиц (димеры и мономеры)

сумоилировании лизин белка-субстрата связывается с белком SUMO (12 кДа), посредством каскада реакций аналогичной системе убиквитинирования. Зрелая молекула SUMO образуется в результате отщепления четырех концевых остатков. В результате С-концевой глицин связывается с лизином субстрата изопептидной связью.

Структура белковой молекулы позволяет определить локализацию этих высоко консервативных сайтов (рис. 1). Оказалось, что лизин K108 лежит на поверхности белковой молекулы и доступен для сумоилирования. Лизин K171 также локализуется в петле на поверхности белка и может как сумоилироваться, так и убиквитинироваться. На рисунке 2 приведена электрофореграмма лизата клеток, ИТФаза локализована с помощью блот-гибридизации. Более стабильные формы дают яркие полосы, менее стабильные – слабые. Известно, что сумоилированное состояние нестабильно и сумоилированная форма дает полосы слабой интенсивности. Рядом приведены теоретически ожидаемые электрофореграммы при сумоилировании и моноубиквитинировании субъединиц.

Кроме того, лизин K171 окружен тремя сайтами фосфорилирования (Y162, Y166, S178). Еще один сайт фосфорилирования локализован в мутантной петле T36 и замена P32T улучшает консервативную последовательность, узнаваемую киназой PKC. Оценка прогноза положительна в обоих случаях и возрастает с

Таблица 1. Потенциальные сайты химической модификации ИТФаза

Программа	Сайт модификации	Окружение	Score	Фермент
UbPred: predictor of protein ubiquitination sites	K171	PKAE	0.67	
SUMOplot™ Analysis Program JASSA	K108 K171 K108	LKPE PKAE LKPE	0.91 Strong consen. Consensus	
NetPhos	T16 T36 T36 T119 S123 T124 S139 Y162 Y166 S178	IVFVTGNAK KFPCTLVAQ KFTCTLVAQ YALCTFALS TFALSTGDP FALSTGDPS RGRSTGRIV QPDGYEQTY YEQTYAEMP KNAVSHRFR	0.868 0.690 0.799 0.847 0.984 0.750 0.957 0.956 0.983 0.773	PKC PKC PKC PKC unsp* PKC unsp unsp unsp unsp

*unsp– non-specific prediction

0,69 до 0,799, оба эти значения лежат в области умеренного уровня консервативности. У киназы РКС наблюдается наибольшее количество сайтов фосфорилирования – 6 сайтов, в их числе четыре с высоким уровнем консервативности. Всего программа выявляет 22 потенциальных сайта фосфорилирования.

Локализация. Изучение локализации белка с помощью флуоресцентных антител показало, что белок локализуется как в цитоплазме, так и в ядре [4]. Причем в цитоплазме он образует сеть вокруг ядра, а в ядре образуются яркие гранулы. Локализация белка сильно различается у линии WI-38 и мутанта P32T. Мутантный белок не образует сетчатую структуру вокруг ядра. Несколько светящихся областей по соседству с ядром присутствуют, но они не структурированы.

Гипотеза. Регуляция активности мутантного белка осуществляется, по-видимому, не в результате выворачивания остатка F31 и последующего узнавания его системой деградации, а в результате тонкой химически модулируемой настройки. На поверхности белка обнаружены консервативные последовательности убиквитинирования, сумоилирования и фосфорилирования. Можно предположить, что мутантная петля служит регулятором связывания регуляторного белка.

Убиквитинирование регулирует деградацию белков (через протеасомы и лизосомы), координирует субклеточную локализацию белков, их активацию и инактивацию, модулирует белок-белковые взаимодействия [29]. Моноубиквитинирование влияет на такие клеточные процессы как транспорт через мембрану и эндоцитоз. Полиубиквитинирование участвует в деградации белков. В противоположность убиквитину, SUMO не используется в качестве метки для деградации. Сумоилирование белков влияет на такие клеточные процессы, как регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта, транскрипции, стабильность белков, митоз, апоптоз, и др. [30]. Особый интерес представляет взаимодействие убиквитинирования и фосфорилирования [31], так как фосфорилирование часто служит маркером событий, в которых убиквитинирование ведет к деградации.

Примером регуляции с помощью химической модификации может служить хорошо изученный фермент рибонуклеотидредуктаза. Рибонуклеотидредуктаза RNR, также, как и нуклеозид трифосфатпирифосфатаза ИТРА, участвует в синтезе пуринов и регуляции баланса нуклеотидов. Комплекс RNR катализирует лимитирующую реакцию в синтезе *de novo* дезоксирибонуклеотидов – образование дезоксирибонуклеотидов из рибонуклеотидов. Сбалансированная продукция дезоксирибонуклеотид-трифосфатов (дНТФ) необходима для точного удвоения генома. Как концентрация в целом, так и баланс между индивидуальными нуклеотидами (дАТФ, дТТФ, дГТФ, и дЦТФ) тонко регулируются рибонуклеотид-редуктазой. Активность рибонуклеотидредуктазы меняется в процессе клеточного цикла, возрастая от первоначально низкого уровня до максимального в фазе S и снижаясь в конце фазы S.

RNR – это тетрамерный комплекс, состоящий из двух больших субъединиц (Rnr1) и двух маленьких (Rnr2 и Rnr4). В процессе клеточного цикла субъединица Rnr1 находится в цитоплазме, в то время как Rnr2 и Rnr4 в ядре. В ответ на начало синтеза ДНК (фаза S) или при повреждении ДНК субкомплекс Rnr2:Rnr4 подвергается checkpoint-зависимому перераспределению между ядром и цитоплазмой и связывается с гомодимером Rnr1, образуя активный комплекс RNR [32-34]. В регуляции участвуют белки Dif1 и Wtm1. Dif1 контролирует субклеточную локализацию субкомплекса Rnr2:Rnr4, непосредственно связываясь с ним и опосредуя ядерный импорт [34, 35]. В то время как Wtm1 служит ядерным якорем и поддерживает ядерную локализацию Rnr2:Rnr4 вне фазы S или в отсутствие повреждений ДНК [34, 36, 37]. В клетках дрожжей в ответ на повреждения ДНК запускается киназный каскад и checkpoint-киназа Rad53 фосфорилирует множество белков, в том числе несколько белков, регулирующих активность RNR, таких как Hug1 (транспорт субъединиц между ядром и цитоплазмой) [38], Sml1 (ингибитор редуктазы), Crt1 (активатор транскрипции генов *RNR*), Dif1 (ядерный импорт). Кроме того, редуктаза ингибируется конечным продуктом (дАТФ).

В числе киназ, потенциально фосфорилирующих фосфатазу ИТРА, есть такие как DNA-ПК (s 0.557, 0.642, 0.528), cdc2 (s 0.509), ATM (s 0.575), СКП (s 0.637). Можно предположить, что фосфатаза регулируется в процессе клеточного цикла и checkpoint-ответа. Возможно, ее экспрессия увеличивается в фазе S, при checkpoint-остановке в случае задержки движения репликативной вилки при повреждении ДНК, при репарации двунитевого разрыва ДНК и повышенной потребности нуклеотидов. Можно предположить, что при повышении синтеза пуринов повышается и уровень неканонических нуклеотидов. Для фосфатазы, также, как и для редуктазы, продемонстрировали ингибирование субстратом [6, 27]. Для понимания молекулярных механизмов регуляции активности фосфатазы и ее инактивации у мутантных форм требуются дальнейшие исследования возможных химических модификаций фосфатазы и их роль в локализации и активации фермента.

В заключение хочу выразить благодарность Душанову Э.Б. за исполнение рисунка 1.

Список литературы / References:

1. Dushanov E.B., Koltovaya N.A. Effect of substitution Pro32Thr on the interaction between dimer subunits of human phosphatase ITPA. *Current Enzyme Inhibition*, 2019, vol. 15, iss. 1, pp. 46-54. DOI: 10.2174/1573408015666190327174841.
2. Stepchenkova E.I., Tarakhovskaya E.R., Spitler K., Frahm C., Menezes M.R., Simone P.D., Kolar C., Marky L.A., Borgstahl G.E., Pavlov Y.I. Functional study of the P32T ITPA variant associated with drug sensitivity in humans. *Journal of Molecular Biology*, 2009, vol. 392 (3), pp. 602-613.

3. Simone P.D., Struble L.R., Kellezi A., Brown C.A., Grabow C.E., Khutsishvili I., Marky L.A., Pavlov Y.I., Borgstahl G.E.O. The human ITPA polymorphic variant P32T is destabilized by the unpacking of the hydrophobic core. *Journal of Structural Biology*, 2013, vol. 182, pp. 197-208.
4. Waisertreiger I.S.-R., Menezes M.R., Randazzo J., Pavlov Y.I. Elevated levels of DNA strand breaks induced by a base analog in the human cell line with the P32T ITPA variant. *Journal of Nuclear Research*, 2010. DOI: 10.4061/2010/872180.
5. Vanderheiden B.S. ITP pyrophosphohydrolases and IDP phosphohydrolase in rat tissue. *The Journal of Cellular Physiology*, 1975, vol. 86, pp. 167-175.
6. Lin S., McLennan A.G., Ying K., et al. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the ITPA gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, pp. 18695-18701.
7. Pang B., McFalline J.L., Burdis N.E., et al. Defects in purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2012, vol. 109, pp. 2319-2324.
8. Abolhassani N., Iyama T., Tsuchimoto D., et al. NUDT16 and ITPA play a dual protective role in maintaining chromosome stability and cell growth by eliminating dIDP/IDP and dITP/ITP from nucleotide pools in mammals. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 38, pp. 2891-2903.
9. Burgis N.E., Brucker J.J., Cunningham R.P. Repair system for noncanonical purines in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2003, vol. 185, pp. 101-110.
10. Noslov V.N., Staak K., Shcherbakova P.V., Kozmin S.G., et al. HAMI, the gene controlling 6-N-hydroxylaminopurine sensitivity and mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, vol. 12, pp. 17-29.
11. Waisertreiger I.S.-R., Menezes M.R., Radazzo J., Pavlov Y.I. Elevated levels of DNA strand breaks induced by a base analog in the human cell line with the P32T ITPA variant. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, vol. 2010, p. 872180.
12. Menezes M.R., Waisertreiger I.S.-R., Lopez-Bertoni H., Luo X., Pavlov Y.I. Pivotal role of inosine triphosphate pyrophosphatase in maintaining genome stability and the prevention of apoptosis in human cells. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, p. e32313.
13. Zamzami M.A., Duley J.A., Price G.R., et al. Inosine triphosphate pyrophosphohydrolases (ITPA) polymorphic sequence variants in adult hematological malignancy patients and possible association with mitochondrial DNA defects. *Journal of Hematology and Oncology*, 2013, vol. 6, p. 24.
14. Rembeck K., Waldenstrom J., Hellstrand K., et al. Variants of the inosine triphosphate pyrophosphatase gene are associated with reduced relapse risk following treatment for HCV genotype 2/3. *Hepatology*, 2014, vol. 59, pp. 2131-2139.
15. Jimmerson L.C., Urban T.J., Truesdale A., et al. Variant ITPA phenotypes are associated with increased ribavirin triphosphate levels. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2016. DOI: 10.1002/jcph.783.
16. Thompson A.J., Fellay J., Patel K., et al. Variants in the ITPA gene protect against dose reduction. *Gastroenterology*, 2010, vol. 139, pp. 1181-1189.
17. Shipkova M., Lorenz K., Oellerich M., Wieland E., von Ahnen N. Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolases (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in Caucasian population. *Clinical Chemistry*, 2006, vol. 52, pp. 240-247.
18. Von Ahnen N., Oellerich M., Armstrong V.W. Characterization of the inosine triphosphatase (ITPA) gene: haplotype structure, haplotype-phenotype correlation and promoter function. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2008, vol. 30, pp. 16-22.
19. Burgis N.E. A disease spectrum for ITPA variation: advances in biochemical and clinical research. *Journal of Biomedical Science*, 2016, vol. 23, pp. 73.
20. Bierau J., Lindhout M., Bakker J.A. Pharmacogenetics significance of inosine triphosphatase. *Pharmacogenomics*, 2007, vol. 8, pp. 1221-1228.
21. Porta J., Kolar C., Kozmin S.G., Pavlov Y.I., Borgstahl G.E. Structure of the orthorhombic form of human inosine triphosphate pyrophosphatase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2006, vol. 62, pp. 1076-1081.
22. Stenmark P., Kursula P., Flodin S., Gräslund S., Landry R., Nordlund P., Schüller H. Crystal structure of human inosine triphosphatase. Substrate binding and implication of the inosine triphosphatase deficiency mutation P32T. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, pp. 3182-3187.
23. Sumi S., Marinaki A., Arenas M., et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase. *Human Genetics*, 2002, vol. 111, pp. 360-367.
24. Arenas M., Duley J., Sumi S., Sanderson J., Marinaki A. The ITPA c.94C>A and g.IVS2+21A>C sequence variants contribute to mis-splicing of the ITPA gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1772, pp. 96-102.
25. Baralle F.E., Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, vol. 18, pp. 437-451.
26. Bakker J.A., Lindhout M., Habets D.D., van den Wijngaard A., Paulussen A.D., Bierau J. The effect of ITPA polymorphisms on the enzyme kinetic properties of human erythrocyte inosine triphosphatase toward its substrates ITP and 6-Thio-ITP. *Nucleotides Nucleic Acids*, 2011, vol. 30, pp. 39-49.
27. Burgis N.E., Cunningham R.P. Substrate specificity of RdgB protein, a deoxyribonucleoside triphosphate pyrophosphohydrolases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, pp. 3531-3538.
28. Herting G., Barber K., Zappala M.R., Cunningham R.P., Burgis N.E. Quantitative *in vitro* and *in vivo* characterization of the human P32T mutant ITPase. *Biochemical and Biophysical Acta*, 2010, vol. 802, pp. 269-274.

29. Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 2009, vol. 37, pp. 937-953.
30. Gareau J.R., Lima C.D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, vol. 11, pp. 861-871.
31. Nguyen L.K., Kolch W., Kholodenko B.N. When ubiquitination meets phosphorylation: a systems biology perspective of EGFR/MAPK signaling. *Cell Communication and Signaling*, 2013, vol. 11, pp. 52-67.
32. Yao R., Zhang Z., An X., Bucci B., Perlstein D.L., Stubbe J., Huang M. Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2003, vol. 100, pp. 6628-6633.
33. An X., Zhang Z., Yang K., Huang M. Cotransport of the heterodimeric small subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase between the nucleus and the cytoplasm. *Genetics*, 2006, no. 173, pp. 63-73.
34. Lee Y.D., Wang J., Stubbe J., Elledge S.J. Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Molecular Cell*, 2008, vol. 32, pp. 70-80.
35. Wu X., Huang M. Dif1 controls subcellular localization of ribonucleotide reductase by mediating nuclear import of the R2 subunit. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, vol. 28, pp. 7156-7167.
36. Zhang Z., An X., Yang K., Perlstein D.L., Hicks L., Kelleher N., Stubbe J., Huang M. Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit requires a karyopherin and a WD40 repeat protein. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2006, vol. 103, pp. 1422-1427.
37. Lee Y.D., Elledge S.J. Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes Development*, 2006, vol. 20, pp. 334-344.
38. Meurisse J., Bacquin A., Richet N., Charbonnier J.B., Ochsenbein F., Peyroche A. Hrg1 is an intrinsically disordered protein that inhibits ribonucleotide reductase activity by directly binding Rnr2 subunit. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, pp. 13174-13185.

MODELING MUTANT HUMAN INOSINE TRIPHOSPHATE PYROPHOSPHOHYDROLASE P32T-ITPA AND POTENTIAL REGULATORY CHEMICAL MODIFICATIONS OF THE ENZYME

Koltovaya N.A.

6 Joliot-Curie St., Joint Institute for Nuclear Research
Dubna, 141980, Russia; e-mail: koltovaya@jinr.ru

Abstract. Base analogs are powerful endogenous antimetabolites and dangerous mutagens forming under oxidative stress, inflammation and aberrant nucleotide synthesis. Human inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) catalyzes the hydrolysis of triphosphates of non-canonic purine bases (ITP, dITP, XTP, dXTP) and thus regulates the nucleotide pool and protects cells from DNA damage. The polymorphic allele c.94C>A, which encodes the enzyme with P32T substitution, causes enzymatic activity loss in erythrocytes and ITP accumulation. An association is observed between the mutant allele P32T-ITPA and adverse sensitivity to purine base analog drugs that are used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and inflammatory intestinal diseases and for preventing organ rejection after transplantation. The inactivation mechanism of the polymorph P32T-ITPA enzyme is unknown. A simulation of the enzyme's mutant form showed weakening of the interconnection between the two subunits [1]. Indeed, the experimental data indicate that the mutant enzyme is less stable but active *in vivo* [2]. The assumption made in the literature that the hydrophobic residue is pushed outside, which is a signal for proteasome degradation, has not been confirmed *in silico* [1]. To understand the mechanism of inactivation *in vivo*, it is necessary to examine the molecular mechanisms of gene expression in more detail. It has been found that alternative splicing and formation of three forms is possible; the latter's proportion being tissue specific. Numerous strips are observed in protein electrophoresis [4]. In the present work, using special programs that identify the potential chemical modification sites, we have determined the potential sites of phosphorylation, ubiquitination, and SUMOylation. It is assumed that chemical modifications participate in the regulation of the enzyme's location and activity. Hypothetic mechanisms are suggested. The results allow us to carry out a further experimental check of the existence of modified forms and to simulate the impact of chemical modifications on enzyme activity.

Key words: single nucleotide polymorphism, ITPA gene, mutant inosine triphosphatase P32T-ITPA, computer simulation, potential sites of regulatory chemical modifications.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В МОЛЕКУЛЕ БЕЛКА ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНИН ПЕРМИАЗЫ CAN1

Колтовая Н.А., Жучкина Н.И., Душанов Э.Б.

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

Поступила в редакцию: 24.07.20

Аннотация. При изучении закономерностей мутагенеза у дрожжей часто используют возникновение прямых мутаций в гене аргинин пермиазы *CAN1*, нарушение которого приводит к канаваин-резистентности. Нами получена представительная коллекция мутаций *can1*, позволяющая провести мутационный анализ структуры аргинин пермиазы. Этот фермент относится к суперсемейству транспортеров, переносящих аминокислоты через клеточные мембраны. Несмотря на несхожесть последовательностей, они обладают схожей структурой. Эукариотическая аргинин пермиаза может служить моделью для изучения структуры и функционирования аналогичных транспортеров. Изучение транспорта аргинина имеет особое значение в связи с тем, что аргинин является одним из ключевых метаболитов в процессах азотистого обмена. Аргинин является субстратом NO-синтаз в синтезе оксида азота NO, универсального трансммиттера, нейромедиатора и участника программируемой гибели клеток.

Ключевые слова: аргинин пермиаза, транспортеры APC-суперсемейства, мутационный анализ структуры фермента.

Молекулярные функции белка тесно связаны со структурой. Изучение изменений структуры и функции в результате мутаций важно для понимания формирования патологического фенотипа. На уровне нуклеотидной последовательности удалось выявить некоторые закономерности возникновения мутаций, например, превышение частоты транзиций над трансверсиями, однонуклеотидные выпадения в полинуклеотидных трэках, возникновение горячих точек рекомбинации, и т.д. Однако на закономерности мутагенеза влияют не только особенности нуклеотидной последовательности, но и селекция на уровне белка. Некоторые мутации нейтральны, например, при замене в третьем нуклеотиде кодона, и не приводят к замене аминокислоты, или не меняют знак аминокислоты, другие локализованы в неактивных участках белка. Какова реальная картина распределения возможных мутаций, инактивирующих фермент? Какова локализация «белых пятен», мутации в которых не нарушают функционирование фермента? Насколько занижена оценка частоты возникновения мутаций? Как сильно частота мутаций отличается для разных генов? Для ответа на эти вопросы необходим анализ конкретных данных по разным генетическим системам.

При изучении закономерностей мутагенеза у дрожжей часто используют прямые мутации в гене аргинин пермиазы, переносящей аргинин через клеточные мембраны. Изучение транспорта аргинина имеет особое значение в связи с тем, что аргинин является одним из ключевых метаболитов в процессах азотистого обмена. Аргинин является субстратом NO-синтаз в синтезе оксида азота NO, универсального трансммиттера, нейромедиатора и участника программируемой гибели клеток. Чрезмерное потребление аргинина иммунными клетками, которые обычно защищают мозг, по-видимому, является одной из причин возникновения болезни Альцгеймера [1].

Дрожжи – удобная модель для изучения функционирования аргинин пермиазы. Включение аминокислот в клетки дрожжей опосредуются ~16 плазмo-мембранными пермиазами, большинство из которых принадлежат к APC (*amino acid-polyamine-organocation*) – суперсемейству транспортеров, найденных во всех живых организмах, включая человека, растения и прокариоты. Транспорт аминокислот через мембрану клеток осуществляется при помощи **вторичного активного** транспорта и **глутатионовой** транспортной системы. Вторичный активный транспорт – это перенос веществ, в данном случае аминокислот, чаще всего с использованием градиента концентрации натрия между внутренней и наружной сторонами клеточной мембраны. Низкая концентрация ионов натрия внутри клеток создается мембранным ферментом Na^+, K^+ -АТФазой. Специфический белок-транспортер связывает аминокислоту и ион натрия. В отсутствие натрия аминокислота **не в состоянии** связаться с белком-переносчиком. Затем, изменив свое положение в мембране, белок отдает ион натрия в цитозоль по градиенту концентрации. Сразу после этого аминокислота теряет связь с белком и остается в цитоплазме. Пермиазы характеризуются субстратной специфичностью. Например, основная аминокислотная пермиаза Gap1 транспортирует все аминокислоты. В то время как Can1, его паралог Alp1, и Lyp1 имеют различную узкую специфичность. Пермиаза Can1 транспортирует аргинин более эффективно, чем лизин (синпортер), Alp1 транспортирует только аргинин (унипортер), в то время как Lyp1 включает эффективно только лизин (унипортер). Таким образом, у дрожжей включение аргинина осуществляется в основном тремя пермиазами Gap1, Can1, Alp1, работающими и как транспортер, и как рецептор. При этом включение аргинина зависит от протонного насоса. Can1 катализирует H^+ /аргинин симпорт и для переноса нужна протон-движущая сила [2]. Клетки, несущие одиночные делеционные мутации генов *CAN1* и паралога *ALP1* жизнеспособны, двойные мутации – летальны. Таким образом, для выживания клеткам нужен хотя бы один неповрежденный ген.

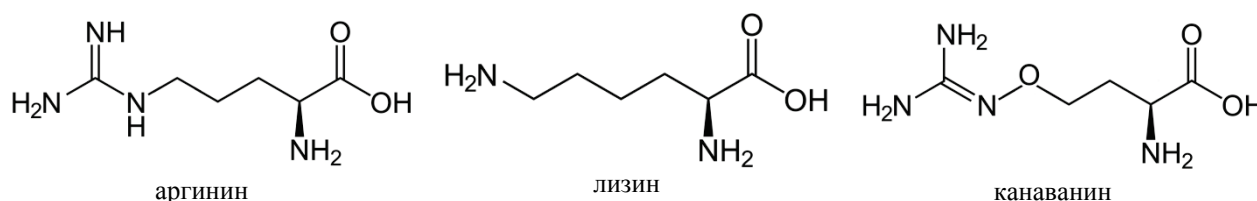


Рисунок 1. Химические формулы аргинина, лизина и канаванина

Интересно, что у дрожжевых нуль-мутантов *can1Δ* увеличивается продолжительность жизни при репликативном старении (уменьшение скорости клеточного деления с увеличением числа прошедших делений) [3].

У дрожжей инактивация гена аргинин пермиазы *CAN1* вызывает устойчивость к канаванину. Основная аминокислота аргинин имеет два основных центра: аминогруппу в α -положении и гуанидиновую в δ -положении. Гуанидиновая группа при протонировании становится сильно основной и способна образовывать множественные водородные связи. Лизин имеет более короткий боковой радикал. Токсичный для клетки канаванин является небелковым аминокислотным аналогом аргинина. В молекулу канаванина по сравнению с аргинином добавлен атом кислорода в боковом радикале и снижено количество CH_2 -групп (рис. 1).

Аргинин пермеаза переносит через клеточную мембрану не только аргинина и лизина, но также и канаванин. В клетке канаванин распознается аргининовой тРНК-синтетазой и в процессе трансляции занимает место аргинина в синтезируемых белках. Однако из-за наличия дополнительного атома кислорода канаванин несет значительно меньший положительный заряд, чем аргинин. Замена аргинина на канаванин приводит к утере белками функциональности, а в результате – к гибели клетки. Мутанты *can1* отбирают на селективной среде, в которую добавлены соли аммония, в качестве единственного источника азота, аргинин отсутствует, и добавлен канаванин. На такой среде клетки дикого типа включают канаванин и гибнут. В мутантных клетках, резистентных к канаванину, аргинин пермеаза теряет сродство к канаванину или инактивируется, и в отсутствии аргинина клетки выживают за счет второго источника азота – солей аммония. Таким образом, селективно отбираются мутации, нарушающие специфичность аргинин пермиазы к канаванину. Но о специфичности к аргинину у этих мутантов мы ничего сказать не можем. На среде с аргинином в качестве единственного источника азота мутанты по аргинин пермеазе, утратившие сродство к аргинину, будут расти за счет функционирования других транспортеров *Alp1* и *Gap1*. Поэтому, для проверки сродства аргинин пермиазы к аргинину необходимо помимо контроля источников азота в среде, заблокировать работу этих транспортеров.

В клетках, растущих на богатой среде, обнаруживается около 10 тыс. молекул *Can1* на клетку [4], локализованных в различных компартментах. Она входит в состав: плазматической мембраны, в том числе мембранные рафты (структурные домены мембраны) [5]; белковых комплексов МСС/эйзосом (сайты плазматической мембраны, служащие маркером эндоцитоза) [6], открытые у дрожжей в 2006 году [7] и являющихся производными эндоплазматической мембраны; эндоплазматического ретикула [8]; в протеоме митохондрий [9, 10]. Хорошо изучена локализация *Can1* в компартменте МСС/эйзосома плазматической мембраны [6]. В состав МСС входит *Can1* и эргостерол, а платформа белков, удерживающая комплекс, называется эйзосомой и локализована она прямо под МСС, а весь комплекс называется МСС/эйзосома. Дрожжевая клетка содержит 30-50 МСС/эйзосомных структур, которые равномерно распределены по поверхности и занимают 3-5% поверхности плазматической мембраны. Только небольшое количество эйзосом активно в каждый момент. Предполагается, что эйзосомы функционируют, используя обратимое фосфорилирование, и регулируют портал, который служит для локализации и транспорта в клетку.

Используя флуоресцентную микроскопию высокого разрешения, показали, что *Can1* и гомологичный транспортер *Lyp1* могут диффундировать в МСС/эйзосома, при этом в условиях ограниченного количества белка они локализуются на внешней стороне компартмента плазматической мембраны. При добавлении субстрата иммобилизованные белки быстро выходят из компартмента МСС/эйзосома. Добавление субстрата изменяет конформацию *Can1* и *Lyp1*, которые разрывают взаимодействия со связанными с ними партнерами, и белок выходит из МСС/эйзосома. Снижение фракции связанного *Can1* с увеличением уровня экспрессии (в то время как увеличивается аргинин- и лизин- транспортная активность), свидетельствует об ограниченном количестве сайтов связывания. В отличие от субстрата протон-движущие силы, по-видимому, не играют роли в распределении *Can1* и *Lyp1* по плазматической мембране.

Аргининовая пермеаза – гомодимер и состоит из 590 аа. Используя платформу ProteinBLAST, мы провели поиск гомологичных последовательностей (табл. 1). Выделено только два гомологичных гена *Alp1* *Lyp1*.

Кристаллическая структура дрожжевых пермиаз в настоящее время отсутствует. Однако в базе данных PDB имеются атомные структуры трех бактериальных белков семейства APC (Табл. 2): антипортеры аргинин/агматин (*AdiC*) и глутамат/ γ -аминомасляная кислота (*GadC*) и протон/аминокислотный симпортер широкой специфичности (*ApcT*). Последовательность *AdiC* проявляет значительную гомологию с глутамат/GABA антипортером *GadC*, лизин/кадаверин антипортером *CadB*, и орнитин/путресцин антипортером *PotE*. По структуре белки аналогичны и состоят из 12 альфа-спиральных трансмембранных сегментов (ТМ), фланкирующих гидрофильный хвост, направленный в цитоплазму. Трансмембранные сегменты образуют два кольца «5+5», которые охватывают сайт связывания субстрата. Такая укладка типична для нескольких семейств транспортеров.

Таблица 1. Белки, имеющие последовательности гомологичные пермиазе Can1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (штамм S280C)

Белок	% идентичности	Организм
Alp1	77,14	<i>Zygosacchar. parabailii</i>
Alp1	68,33	<i>S. cerevisiae</i>
Lyp1	62,77	<i>S. cerevisiae.</i>
AdiC	15	<i>E. coli</i>

В своей работе для моделирования мы использовали кристаллическую структуру холо-фермента AdiC (PDB: 3L1L и 3OB6) [11,12] в открытой конформации с аргинином в качестве субстрата. Большую часть молекулы построили с помощью программы VMD [17], длинные петли P258-L285, Y345-Y356, L478-L488 и F515-V525 формировали с помощью программы MODELLER [18]. Молекулу канаванина встроили в молекулу пермиазы Can1, ориентируя на положение аргинина. На Рисунке 2 приводится вид пермиазы сбоку, сверху и снизу. Внешнее кольцо ТМ-элементов состоит из ТМ2, ТМ4, ТМ5, ТМ7, ТМ9. Остальные ТМ элементы (ТМ1, ТМ3, ТМ6, ТМ8 и ТМ10) образуют внутреннее кольцо, с сайтами связывания субстрата. Элементы ТМ11 и ТМ12 не входят в состав «5+5» структуры.

Был проведен анализ нуклеотидной последовательности мутаций Can^R, возникших спонтанно или полученных при облучении УФ – и гамма-лучами, а также тяжелыми ионами. Кроме того, часть мутаций была любезно предоставлена д-ром Р.Д. Колоднером. Были отобраны мутации, вызывающие замены аминокислотных остатков. В нашем распоряжении оказались нуклеотидные последовательности 122 мутаций, затрагивающих 82 ао. Анализируемые мутации обнаруживаются как в ТМ, так и между ними. ТМ-элементы отличаются как по длине, так и по количеству обнаруженных в них мутаций (табл. 3). Мутации обнаруживаются во всех ТМ элементах кроме ТМ12, причем важны как сегменты, составляющие внутреннее кольцо, так и внешнее. Хотя во внутреннем кольце мутаций больше.

Таблица 2. Кристаллические структуры белков APC-семейства, имеющиеся в базе PDB

Фермент	Функция	Организм	Код PDB (разрешение, Å) Форма (субстрат)	Источник
AdiC	Аргинин/агматинантпортер	<i>E. coli</i>	3L1L (3.00 Å) A, apo, holo (аргинин) 3OB6 (3.00 Å) A, B holo (аргинин) Open-to-out 5J4N (2.594 Å) A, B holo (агматин) 5J4I (2.21 Å) A, B apo	[11] [12] [13] [13]
GadC	Глутамат/γ-аминомасляная кислота антипортер	<i>E. coli</i>	4DJK (3.097 Å) A, B apo (inward) 4DJI (3.187 Å) A, B apo (inward)	[14] [14]
АрсТ	Протон/аминокислота симпортер широкой специфичности	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	3GI8 (2.59 Å) C, apo (occluded - OF) 3GI9 (2.48 Å) C, apo 3GIA (2.32 Å) A (bicine)	[15] [15] [15]
АрсТ	Аминокислотный транспортер	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	6F34 (3.13 Å) A (аргинин)	[16]

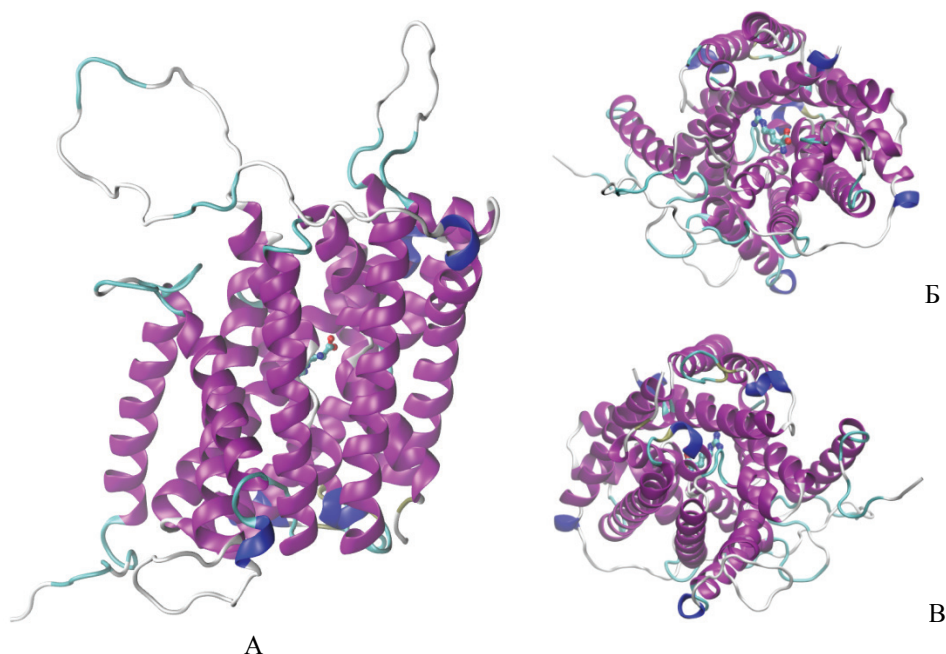


Рисунок 2. Построенная с помощью программы MODELLER 3Д-модель пермеазы Can1 в outward-open occluded состоянии с аргинином в качестве субстрата. Концевые TM11 и TM12 не являются частью характерной «5+5» упаковки. В центре молекулы располагается субстрат Arg (шарики). Две длинные петли, выступающие за поверхность молекулы, располагаются между TM5-TM6 и TM7-TM8. А, вид сбоку. Б, вид сверху. В, вид снизу.

Часть мутаций можно охарактеризовать, используя имеющиеся в литературе данные [19]. Для моделирования в качестве базовой авторы также использовали кристаллическую структуру AdiC (PDB: 3L1L) холо-фермента с аргинином в качестве субстрата. Модельная структура белка Can1 была построена для анализа структурных особенностей, определяющих специфичность аргинин пермеазы. С помощью модели были выявлены аминокислотные остатки, необходимые для связывания субстрата, и также мутации, конвертирующие аргининовую пермеазу в лизиновую. Для связывания субстрата необходимы следующие остатки: T456 (TM10), S176 (TM3), W177 (TM3), E301 (TM6), E184 (TM3), F295 (TM6), T101 (TM1), T104 (TM1), G103 (TM1), G105 (TM1). В Таблице 4 приведены основания, определяющие связывание и специфичность субстрата, а также мутации, вызывающие изменение специфичности к канаванину. Показано, что два основания в связывающем сайте влияют на селективность Can1. Замены T456 (TM10) на A и S не влияют на транспорт аргинина и лизина, в то же время замены S176 (TM3) на A и N снижают транспорт аргинина, особенно в последнем случае. S176N не способен также к транспорту лизина. В то же время двойной мутант S176N T456S не транспортирует аргинин, но транспортирует лизин. Остаток E184 высоко консервативен и его протонирование сильно влияет на

Таблица 3. Количество мутаций в трансмембранных (TM) сегментах

TM сегмент	Остатки	Размер, н	Число мутаций
TM1	93-111	19	10
TM2	119-138	19	3
TM3	168-193	26	7
TM4	199-218	20	2
TM5	227-252	26	5
TM6	283-307	25	6
TM7	328-345	18	5
TM8	378-396	20	5
TM9	421-439	19	3
TM10	452-469	18	4
TM11	493-510	28	2
TM12	524-547	24	0
Всего: внутренние		108	20
внешние		102	32

Таблица 4. Характеристика некоторых аминокислотных остатков

Сайт	Замена остатка	Функция
T101 (TM1)		Связывание NH_3^+Arg .
G103 (TM1)	G103C, G103V, G103D	Связывание COO^-Arg .
T104 (TM1)	T104I, T104R, T104A	Связывание COO^-Arg (остов, боковой радикал).
F295 (TM6)		Связывание NH_3^+Arg .
Q298 (TM6)	Q298K	Связывание NH_3^+Arg .
F295 (TM6)		Взаимодействие боковых цепей (CH_2).
E301 (TM6)		Взаимодействие боковых цепей (гуанидин ⁺). Протонирование?
W177 (TM3)	W177G	Взаимодействие боковых цепей (гуанидин ⁺).
S176 (TM3)	S176Y <i>S176A, S176N</i> <i>S176N (TM3) T456S (TM10)</i>	Взаимодействие боковых цепей (гуанидин ⁺). Транспорт (-Can). Транспортная селективность (-Arg, -Lys). Транспортная селективность (-Arg, +Lys).
T180 (TM3)	T180R T180P	Протонирование. Связывание субстрата. Транспорт (-Can).
E184 (TM3)	<i>E184Q or E184A</i> E184K, E184V <i>E184D</i>	Транспортная селективность (-Arg, -Lys). Протонирование. Способствует убиквитинированию. Транспорт (-Can). Передача субстрата через мембрану.
T456 (TM10)	<i>T456S</i>	Взаимодействие боковых цепей (гуанидин ⁺). Транспортная селективность (+Arg, +Lys). Блокирует убиквитинирование. Резистентный к эндоцитозу. Гиперактивен.

Курсивом обозначены мутации из [19,27]

ориентацию бокового радикала аргинина. Замена глутамата E184 на Q (имитирует необратимое протонирование E184) или A в сайте связывания приводит к неспособности транспортировать любую аминокислоту. Предполагается возможная роль глутамата в сцеплении транспорта аргинина с потоком протонов.

Интересно, что в нашей коллекции мутаций были мутации, выделенные Прево с коллегами [19] и определяющие специфичность к аргинину и лизину. Они же определяли и специфичность к канаванину. В результате этих мутаций аргинин пермиаза утрачивала специфичность к канаванину. На рисунке 3 приведено расположение аргинина и канаванина в сайте связывания.

Для функционирования ферментов важна не только первичная последовательность, которая определяет пространственную структуру белка, но регуляторные сайты, например, сайты связывания регуляторных белков или химической модификации. В SGB базе данных есть информация по химическим модификациям белков, в частности по фосфорилированию и убиквитинированию. В таблице 5 приведены сайты фосфорилирования и убиквитинирования аргинин пермиазы Can1. Причем, как правило, фосфорилирование предшествует убиквитинированию и служит сигналом деградации [20].



Рисунок 3. Расположение аргинина (А) и канаванина (Б) в сайте связывания

Таблица 5. Сайты химической модификации аргинин пермиазы Can1

Сайт	Модификация	Источник
S4	фосфорилирование	Swaney et al., 2013 [20]
K5	убиквитинирование	Kolawa et al., 2013 [21]
K5	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]
K5	убиквитинирование	Fang et al., 2014 [22]
S38	фосфорилирование	Swaney et al., 2013 [20]
S38	фосфорилирование	Soulard et al., 2010 [23]
S38	фосфорилирование	Holt et al., 2009 [24]
K42	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]
K47	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]
S66	фосфорилирование	Swaney et al., 2013 [20]
K85	убиквитинирование	Swaney et al., 2013 [20]

На приведенной аминокислотной последовательности аргинин пермиазы сайты фосфорилирования и убиквитинирования выделены синим, а полученные нами сайты замен аминокислотных остатков (Can^R) – красным:

1 MTNSKEDADI EEKHYNEPV TFLFDVEAS QTHHRRGSIP LKDEKSKELY PLRSFPTRVN
61 GEDTFSMEDG IGDEDEGEVQ NAEVKRELKQ RHIGMIALGG TI^{GTGL}FI^{GL} STPLTNA^{GPV}
121 GALISYLFMG SLAYSVTQSL GEMATFIPVT SSFTVFSQRF LSPAFAANG YMYWFSWAIT
181 FAL^{EL}SVVGQ VIQFWTYKVP LAAWISFWV IITIMNLFPV KY^{YGEFE}FWV ASIKVLAIG
241 FLIYCFMVC GAGVTGPVGF RYWRNPGAWG PGIISKDKNE GRFLGWVSSL INAA^{FTFOGT}
301 ELVGITAGEA ANPRKSVRA IKKVVRILT FYIGSLLFIG LLVPYNDPKL TQSTSYVSTS
361 PFPAIENSG TKVLPHIFNA VILTTISAA NSNIYVGSRI LFGLSKNKLA PKFLSRTTKG
421 GVPYIAVFVT AAFGALAYME TSTGGDKVFE WLLNITGVAG FFAWLFISIS HIRFMQALKY
481 RGISRDELPF KAKLMPGLAY YAATFMTIII IQGFATAFAP KFN^{GV}SFAAA YISIFLFLAV
541 WILFQCIFRC RFIWKIGDVD IDSDRRDIEA IVWEDHEPKT FWDKFWNVVA *

Интересно, что все сайты фосфорилирования и убиквитинирования располагаются в длинном N-конце перед первым трансмембранным сегментом TM1, отсутствующем у бактериального белка AdiC. В этом фрагменте мы не обнаружили мутаций Can^R. Ближайшая к N-концу мутация, которую мы получили, L88H.

Широко распространенным способом ингибирования функционирования специфических плазмомембранных рецепторов, транспортеров и каналов является селективная сортировка этих белков в эндосомальные везикулы, с последующим эндосомальным трафиком и доставкой к лизосомам, где они деградируются [25]. У дрожжей *S. cerevisiae* убиквитинирование поверхностных белков опосредуется НЕСТ-семейством убиквитин лигаз Rsp5, доставку которых обеспечивают аррестин-подобные адапторы Art1 (arrestin-related trafficking) [26]. В частности активность пермиазы Can1 в ответ на изменение концентрации субстрата подавляется, и это подавление обусловлено не внутриклеточным накоплением транспортируемых аминокислот, а непосредственно самим катализом [27]. Для индуцированного субстратом убиквитин-зависимого эндоцитоза необходим переход пермиазы в специфическое конформационное состояние, предшествующее выходу субстрата в клетку. Это промежуточное состояние достаточно стабильно для того чтобы произошло подавление пермиазы. Субстрат индуцированное изменение конформации, активирующее эндоцитоз, включает в себя перестройку цитозольной области пермиазы, тем самым обеспечивая ее узнавание аррестин-подобным адаптором убиквитин лигазы Rsp5. Согласно гипотезе субстрат-индуцированного убиквитинирования и последующего эндоцитоза после связывания субстрата пермиаза переходит сначала в outward-open-occluded, а затем в inward-open-occluded состояния, предшествующее выходу субстрата в цитозоль. В inward-open состоянии пермиаза склонна к убиквитинированию. Обнаружены замены аминокислотных остатков, препятствующие прохождению этих этапов. Так в случае T180R пермиаза не способна связать субстрат. Замена E184D блокирует дальнейший переход в inward-open-occluded состояние. В случае E184Q в присутствии Arg пермиаза переходит в состояние, в котором убиквитинирование предпочтительнее выхода субстрата в клетку. Наблюдение, что неактивная E184Q подвергается нормальному эндоцитозу, предполагает, что структурные изменения предшествуют депротонизации E184. Эта депротонизация, вероятно сцепленная с протонизацией другого остатка Can1, существенна для выхода аргинина в клетку. При замене T456S состояние, предпочтительное для убиквитинирования, нестабильно и недостаточно для обеспечения эффективного эндоцитоза. Конформационные изменения, способствующие убиквитинированию, включают N-концевой хвост, который возможно

взаимодействует с внутренней петлей пермиазы, тем самым делая терминальный лизин более доступным для убиквитинирования лигазой Rsp5, как это наблюдается в случае урацил пермиазы Fur4 [28]. Убиквитинирование пермиазы контролируется непосредственно фосфорилированием/ убиквитинированием адапторов [29].

В дальнейшем планируется провести мутационный анализ структуры пермиазы, специфики локализации мутаций *can1*, дать обоснования связи структурных и функциональных изменений, а также провести динамическое моделирование исходной и мутантных форм аргинин пермиазы.

Список литературы / References:

1. Kan M.J., Lee J.E., Wilson J.G., et al. Arginine deprivation and immune suppression in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 2015, vol. 35, pp. 5969-5982.
2. Opekarova M., Caspari T., Tanner W. Unidirectional arginine transport in reconstituted plasma-membrane vesicles from yeast overexpressing CAN1. *European Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 211, pp. 683-688.
3. McCormick M.A., Delaney J.R., Tsuchiya M., Tsuchiyama S., Shemorry A., Sim S., Chou A.C., Ahmed U., Carr D., Murakami C.J., et al. A Comprehensive analysis of replicative lifespan in 4,698 single-gene deletion strains uncovers conserved mechanisms of aging. *Cell Metabolism*, 2015, vol. 22, pp. 895-906.
4. Ho B., Baryshnikova A., Brown G.W. Unification of protein abundance datasets yields a quantitative *Saccharomyces cerevisiae* proteome. *Cell Systems*, 2018, vol. 6, pp. 192-205.e3.
5. Malinska K., Malinsky J., Opekarova M., Tanner W. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Cell Science*, 2004, vol. 117, pp. 6031-6041.
6. Bianchi F., Syga Ł., Moiset G., Spakman D., Schavemaker P.E., Punter C.M., Seinen A.B., van Oijen A.M., Robinson A., Poolman B. Steric exclusion and protein conformation determine the localization of plasma membrane transporters. *Nature Communications*, 2018, vol. 9, p. 501.
7. Walther T.C., Brickner J.H., Aguilar P.S., Bernales S., Pantoja C., Walter P. Eicosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*, 2006, vol. 439, pp. 998-1003.
8. Yofe I., Weill U., Meurer M., Chuartzman S., Zalckvar E., Goldman O., Ben-Dor S., Schütze C., Wiedemann N., Knop M., Khmelinskii A., Schuldiner M. One library to make them all: streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nature Methods*, 2016, vol. 13, pp. 371-378.
9. Sickmann A., Reinders J., Wagner Y., Joppich C., Zahedi R., Meyer H.E., Schönfisch B., Perschil I., Chacinska A., Guiard B., Rehling P., Pfanner N., Meisinger C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2003, vol. 100, pp. 13207-13212.
10. Reinders J., Zahedi R.P., Pfanner N., Meisinger C., Sickmann A., et al. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, 2006, vol. 5, pp. 1543-1554.
11. Gao X., Zhou L., Shi Y. Structure of Arg-bound *Escherichia coli* AdiC. *Nature*, 2010, vol. 463, pp. 828-832.
12. Kowalczyk L., Ratera M., Paladino A., Bartoccioni A., Errasti-Murugarren E., Valencia E., Portella G., Bial S., Zorzano A., Fita I., Orozco M., Carpena X., Vazquez-Ibar J.L., Palacin M. Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2011, vol. 108, pp. 3935-3940.
13. Ilgue H., Jeckelmann J.M., Gapsys V., Ucurum Z., de Groot B.L., Fotiadis D. Insight into the molecular basis for substrate binding and specificity of the wild-type L-arginine/ agmatine antiporter AdiC. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 2016, vol. 113, pp. 10358-10363.
14. Ma D., Lu P.L., Yan C.Y., Fan C., Yin P., Wang J.W., Shi Y.G. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature*, 2012, vol. 483, pp. 632-636.
15. Shaffer P.L., Goehring A.S., Shankaranarayanan A., Gouaux E. Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science*, 2009, vol. 325, pp. 1010-1014.
16. Jungnickel K.E.J., Newstead S. Crystal structure of a bacterial cationic amino acid transporter (CAT) homologue bound to Arginine. *Nature Communications*, 2018, vol. 9, pp. 550-550.
17. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
18. Šali A., Blundell T.L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 1993, vol. 234, pp. 779-815.
19. Ghaddar K., Krammer E.-M., Mihajlovic N., Brohée S., André B., Prévost M. Converting the yeast arginine Can1 permease to a lysine permease. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, pp. 7232-7246.
20. Swaney D.L., Beltrao P., Starita L., Guo A., Rush J., Fields S., Krogan N.J., Villén J. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature Methods*, 2013, vol. 10, pp. 676-682.
21. Kolawa N., Sweredoski M.J., Graham R.L., Oania R., Hess S., Deshaies R.J. Perturbations to the ubiquitin conjugate proteome in yeast δ ubx mutants identify Ubx2 as a regulator of membrane lipid composition. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, vol. 12, pp. 2791-2803.
22. Fang N.N., Chan G.T., Zhu M., Comyn S.A., Persaud A., Deshaies R.J., Rotin D., Gsponer J., Mayor T. Rsp5/Nedd4 is the main ubiquitin ligase that targets cytosolic misfolded proteins following heat stress. *Nature Cell Biology*, 2014, vol. 16, pp. 1227-1237.

23. Souillard A., Cremonesi A., Moes S., Schütz F., Jenö P., Hall M.N.I. The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, vol. 21, pp. 3475-3486.
24. Holt L.J., Tuch B.B., Villén J., Johnson A.D., Gygi S.P., Morgan D.O. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 2009, vol. 325, pp. 1682-1686.
25. Lauwers E., Erpapazoglou Z., Haguenaue-Tsapis R., Andre B. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends in Cell Biology*, 2010, vol. 20, pp. 196-204.
26. Becuwe M., Herrador A., Haguenaue-Tsapis R., Vincent O., Leon S. Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family. *Biochemistry Research International*, 2012, 242764. DOI: 10.1155/2012/242764.
27. Ghaddar K., Merhl A., Saliba E., Krammer E.-M., Prevost M., Andre B. Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Molecular and Cellular Biology*, 2014, vol. 34, pp. 4447-4463.
28. Keener J.M., Babst M. Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4. *Traffic*, 2013, vol. 14, pp. 412-427.
29. Lin C.H., MacGurn J.A., Chu T., Stefan C.J., Emr S.D. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*, 2008, vol. 135, pp. 714-725.

LANDSCAPE OF MUTATION SUBSTITUTIONS IN YEAST ARGININE CAN1 PERMEASE

Koltovaya N.A., Zhuchkina N.I., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

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

Abstract. The occurrence of forward mutations in the arginine permease *CAN1* gene, where damage leads to canavanine resistance, is often used to study mutagenesis in yeasts. We have obtained a representative collection of *can1* mutations, which enables the mutational analysis of the arginine permease structure. This transport enzyme belongs to the APC superfamily supplying amino acids to cells. Despite sequence nonidentity, they have a similar structure. Eukaryotic arginine permease can serve as a model for the analysis of the structure and functioning of similar transporters. Studying arginine transport is of particular importance due to arginine being one of the key metabolites in nitrogen metabolism. Arginine is the NO-synthase substrate in NO synthesis, universal transmitter, neuromediator and actor of programmed cell death.

Key words: arginine permease, conveyors ARS-supersmash, mutational analysis of the structure of the enzyme.

БИОКОНЬЮГИРОВАНИЕ КОЛЛОИДНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК СУЛЬФИДОВ КАДМИЯ И НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР БЕЛКА-ПОРИНА ИЗ БАКТЕРИЙ РОДА *YERSINIA*. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

Набережных Г.А.¹, Сергеев А.А.², Портнягина О.Ю.¹, Чистюлин Д.К.¹, Сидорин Е.В.¹, Новикова О.Д.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: naber1953@mail.ru

² Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН

г. Владивосток, 690022, РФ

Поступила в редакцию: 24.07.20

Аннотация. Флуоресцентные квантовые точки (КТ) на основе сульфида кадмия являются перспективными материалами для оптики, оптоэлектроники, биологии и медицины. В последние годы наметился значительный прогресс в использовании наноматериалов для создания биосенсоров, в том числе с использованием белковых структур. Нативные или искусственно сконструированные биосенсоры с использованием ион-проводящих каналов являются весьма перспективным классом наноструктур. В данной работе апробированы различные подходы для формирования упорядоченных надмолекулярных структур поринов иерсиний (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. ruckeri*), меченных КТ: (1) конъюгирование пориновой матрицы с предварительно полученными стабилизированными КТ и (2) синтез КТ в предварительно сформированной на слюде пориновой матрице в поддерживающем липидном бислое. Размеры КТ и их конъюгатов с белками измеряли с помощью метода динамического рассеяния света (непосредственно в водной суспензии). Морфологию поверхности образцов исследовали методом атомно-силовой микроскопии. Для характеристики оптических свойств полученных конъюгатов была использована сканирующая флуоресцентная спектроскопия. Обнаружено, что интенсивность люминесценции биоконъюгатов существенно зависит от способа приготовления КТ и образца белка (изолированный порин или комплекс порин-пептидогликан). Показано что в зависимости от типа образца в спектрах возбуждения люминесценции наблюдается сдвиг края фундаментального поглощения КТ. Это указывает на формирование различных по диаметру КТ и, следовательно, на возможность управления их размерами в зависимости от структуры белковой матрицы. Полученные данные открывают перспективу использования наноструктур на основе бактериальных поринов, меченных КТ, в качестве биосенсоров.

Ключевые слова: порин, сульфид кадмия, квантовые точки, конъюгация, люминесценция.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наметился значительный прогресс в использовании наноматериалов для создания биосенсоров, в том числе с использованием белковых структур, которые, вследствие их эндогенной способности к самосборке и молекулярному распознаванию, являются идеальными наноструктурированными шаблонами для разработки и синтеза наноматериалов. Квантовые точки (КТ) представляют собой полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы, размеры которых меньше боровского радиуса экситона [1], величина которого для сульфида кадмия составляет порядка 5,8 нм [2]. При указанных размерах в наночастицах начинает проявляться квантово-размерный эффект – зависимость оптических свойств (поглощение и люминесценция) от размера частицы. Благодаря этим необычным свойствам, КТ представляют собой новое поколение флуорохромов, обладающих значительными преимуществами по сравнению с традиционными органическими красителями, такими как флуоресцеин, родамин и их производные FITC и TRITC, и флуоресцентными белками – фикоэритрином (PE), зеленым флуоресцентным белком (GFP) и др.

Уникальные оптические свойства КТ позволяют использовать их практически во всех системах мечения и визуализации биологических объектов. В связи с этим, применение квантовых точек в иммуногистохимии, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH и аналогичные методы) и в проточной цитометрии является весьма перспективным. Комбинация техники биочипов и полупроводниковых КТ позволяет увеличить чувствительность метода и значительно повысить число детектируемых объектов (степень мультиплексности). Такой подход должен обеспечить существенный прорыв в решении задач протеомики и клинической диагностики, а также при идентификации различных молекулярных маркеров в целях понимания внутриклеточных механизмов.

В данной работе апробированы различные подходы для формирования новых люминесцентных биоконструктов, перспективных для задач оптической сенсорики, состоящих из упорядоченных надмолекулярных структур поринов иерсиний (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. ruckeri*), меченных КТ: (1) конъюгирование пориновой матрицы с предварительно полученными стабилизированными КТ и (2) синтез КТ на предварительно сформированной на слюде пориновой матрице в поддерживающем липидном бислое.

Применение различных способов синтеза КТ и мечения ими белковой матрицы позволит получить функциональные сенсорные структуры, реагирующие на воздействие аналитов различной природы (ионы металлов и/или биомолекулы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование бактерий. В работе использовали штамм H-557 *Y. pseudotuberculosis* 0:1В серовара. Культивирование микроорганизмов проводили при 4 °C на питательном бульоне (Махачкала, Россия) в колбах (1л) с интенсивной аэрацией в течение 5 суток.

Выделение порина и его комплексов с пептидогликаном (ПГ). Комплекс ПГ-порин из *Y. pseudotuberculosis* (YpПГ) получали экстракцией бактериальных клеток ионным детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН) по методу Розенбуша [3]. Изолированные порины получали согласно процедурам, описанным в работах: [4] для порина из *Y. pseudotuberculosis* (YpOmpF) и [5] для порина из *Y. ruckeri* (YrOmpF). Для очистки белков использовали гель-хроматографию на Sephacryl S-300 HR (Pharmacia, Швеция) в Трис-HCl буфере (0,03 М, pH 7,5), содержащем 0,25 % ДСН. В результате был получен электрофоретически гомогенные образцы поринов, содержащие исследуемые белки в нативной тримерной форме.

Получение стабилизированных КТ. Синтез квантовых точек сульфида кадмия проводили по методу описанному в работе [6]. Для синтеза квантовых точек сульфида кадмия были приготовлены водные растворы ацетата кадмия (7 мМ), меркаптоянтарной кислоты (14 мМ), используемой в качестве стабилизатора квантовых точек и сульфида натрия (7 мМ). Смешение растворов (при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке) проводили в следующей последовательности: в раствор меркаптоянтарной кислоты вводили раствор ацетата кадмия, а затем добавляли NaOH до pH раствора 10,0. Полученную смесь продолжали перемешивать на водяной бане при 60 °C в течение 30 мин. В течение следующих 30 мин в смесь по каплям добавляли раствор сульфида натрия. Полученную реакционную смесь нагревали в термостате Binder 53 (Binder, Германия) при температуре 80 °C в течение часа. Для очистки от непрореагировавших компонентов реакционной смеси синтезированные квантовые точки осаждали этанолом (1:5 v/v по отношению к объему раствора КТ) с последующим суспендированием полученного осадка в дистиллированной воде.

Получение пориновой матрицы на слое и введение в нее КТ. Формирование на слое поддерживающего липидного бислоя из липосом (SLB-support lipid bilayer), состоящих из дидодецилфосфатидил холина, и последующую реконструкцию образцов порина и ПГ-порин осуществляли по методу [7]. Для включения порина или ПГ-порина в предварительно сформированный бислой на слой наносили 10 мкл порина (100 мкг/мл) в ацетатном буфере (0,05 М, pH 5,5), выдерживали в течение 1 ч и отмывали от несвязавшегося белка ацетатным буфером. Конъюгацию КТ с иммобилизованными белками проводили двумя методами. В первом методе предварительно полученные КТ связывали с белками помощью водорастворимого карбодиимида (Sigma, США). Во втором методе КТ получали непосредственно на иммобилизованных белках. На слой с порином наносили 10 мкл раствора 7 мМ CdCl₂ в воде, затем наносили 10 мкл раствора 7 мМ Na₂S в воде и смесь выдерживали в течение 60 мин при 25 °C. Несвязавшиеся реагенты отмывали ацетатным буфером (5 раз по 20 мкл).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Морфологию поверхности образцов исследовали с помощью атомно-силового микроскопа Nano DST (PNI, USA). Изображения получали в полуконтактном режиме с использованием сверхострого кантилевера с диаметром острия 1 нм.

Метод динамического рассеяния света (ДРС). Измерение размеров КТ и их конъюгатов с белками в растворе было проведено методом ДРС с использованием прибора ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания), оснащенный He-Ne-лазером ($\lambda = 633$ нм, 4 мВт), в кювете 10 x 10 мм при температуре 20 °C при фиксированном угле рассеяния 173°. Время накопления данных составило 15-30 мин. Расчет Z average (среднего гидродинамического радиуса частиц образца) и R_n (гидродинамического радиуса) частиц при анализе их числового распределения выполняли с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS, «Malvern», Великобритания).

Метод сканирующей лазерной конфокальной микроскопии. Спектры люминесценции образцов измеряли с помощью спектрофлуориметра FluoroLog 3 (Horiba, Япония). В качестве источника излучения использовали широкополосную ксеноновую лампу со средней мощностью 450 Вт. Спектры люминесценции регистрировали с шагом 1 нм при времени усреднения 0,1 с. Максимум возбуждения люминесценции находился в пределах от 300 до 450 нм (4,15-2,75 эВ) и зависел от размеров полученных квантовых точек в исследуемых образцах, которые, в свою очередь, определялись условиями синтеза.

Средние размеры люминесцирующего ядра КТ (без учета стабилизирующей оболочки) определялись методом эффективных масс электрона и дырки [1]. Этот метод основан на определении энергии оптического перехода между известными уровнями размерного квантования электронов и дырок, зависящей от размеров КТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нашего исследования были получены конъюгаты изолированного порина с КТ в растворе. С помощью метода ДРС были определены размеры частиц исходных компонентов и конъюгатов белка с КТ. Как следует из данных рисунка 1 и таблицы 1, при связывании порина с КТ наблюдается следующее: увеличивается

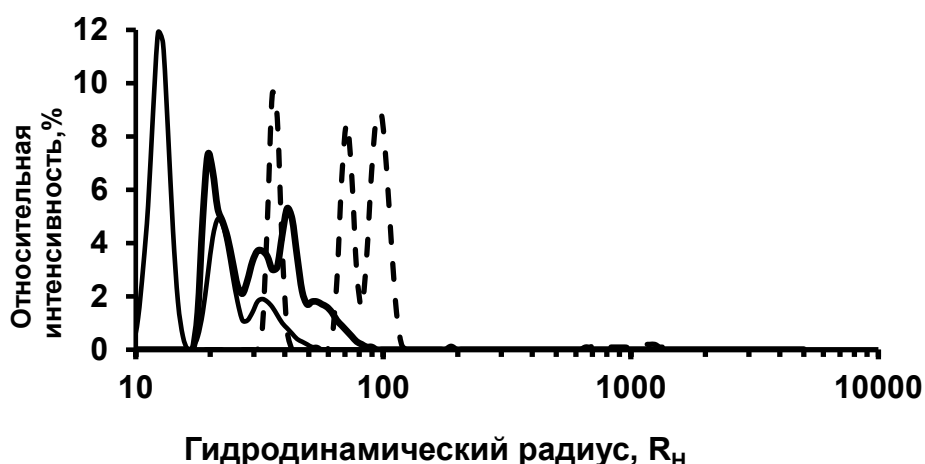


Рисунок 1. Числовое распределение по размеру частиц: исходные КТ (пунктирная линия); порин (сплошная тонкая линия) и порин конъюгированный с КТ (сплошная толстая линия)

размер частиц порина (1), происходит значительное разукрупнение частиц КТ, при этом не только уменьшаются размеры КТ, но и изменяется соотношение отдельных фракций по сравнению с исходным образцом КТ (2). В полученном полидисперсном биоконъюгате преобладают частицы со средним гидродинамическим радиусом $R_n = 19,54$ нм (40%). Данный эксперимент свидетельствует о том, что значительная часть изолированного порина связывается с КТ в этих условиях.

Ранее нами были подобраны условия формирования пориновой матрицы на поверхности слюды [7]. Было показано, что слабо-кислая среда (рН 5,0) является оптимальной для включения изолированного порина в поддерживающий липидный бислой. Кроме того, было обнаружено, что при использовании комплекса порина с ПГ в качестве белкового препарата образовывалась наиболее упорядоченная наномолекулярная структура.

На рисунке 2 приведены АСМ-изображения, иллюстрирующие основные этапы создания надмолекулярных структур белка-порина из *Y. pseudotuberculosis* и его комплекса с ПГ и их биоконъюгатов с квантовыми точками сульфида кадмия (КТ CdS). При нанесении поддерживающего липидного слоя (рис. 2а) на подложке формируются разрозненные массивы с шириной на полувысоте порядка 25 нм и высотой около 3 нм (рис. 3). Добавление изолированного порина приводит к формированию на поверхности подложки сплошной пленки, покрывающей в том числе массивы липидного слоя (рис. 2б). В результате латеральные размеры массивов липидного слоя увеличиваются примерно в два раза: их ширина на полувысоте составляет около 50 нм, а высота – 5 нм (рис. 3).

В случае использования комплекса ПГ-белок (рис. 2в) сформированная пленочная структура становится более выраженной. На большей части поверхности образца толщина матрицы составляет 5 нм, наблюдаются также, как и в случае изолированного порина, четко выраженные участки липидного слоя увеличенной толщины, ширина на полувысоте – 50 нм, высота – 5 нм (рис. 3). При мечении данной структуры готовыми КТ CdS, конъюгированных с помощью водорастворимого карбодиимида, отчетливо видны отдельные структуры высотой до 10 нм, по всей видимости, являющиеся связанными с белком КТ (рис. 2г).

Таблица 1. Значения гидродинамических радиусов КТ, изолированного порина из *Y. pseudotuberculosis* (YpOmpF) и YpOmpF, конъюгированного с КТ. В скобках приведена относительная интенсивность в %

	г. нм (%)	г. нм (%)	г. нм (%)	г. нм (%)	г. нм (%)	г. нм (%)
КТ	94,02 (41)	71,26 (28,5)	35,63 (27,9)	752 (0,8)	1140 (1,5)	496,2 (0,2)
порин	12,31 (56,4)	21,43 (28,9)	32,48 (14,3)	78,15 (0,4)	-	-
порин-КТ	19,54 (39,7)	40,93 (26,2)	32,48 (20,4)	54,0 (13,0)	188 (0,2)	108 (0,1)

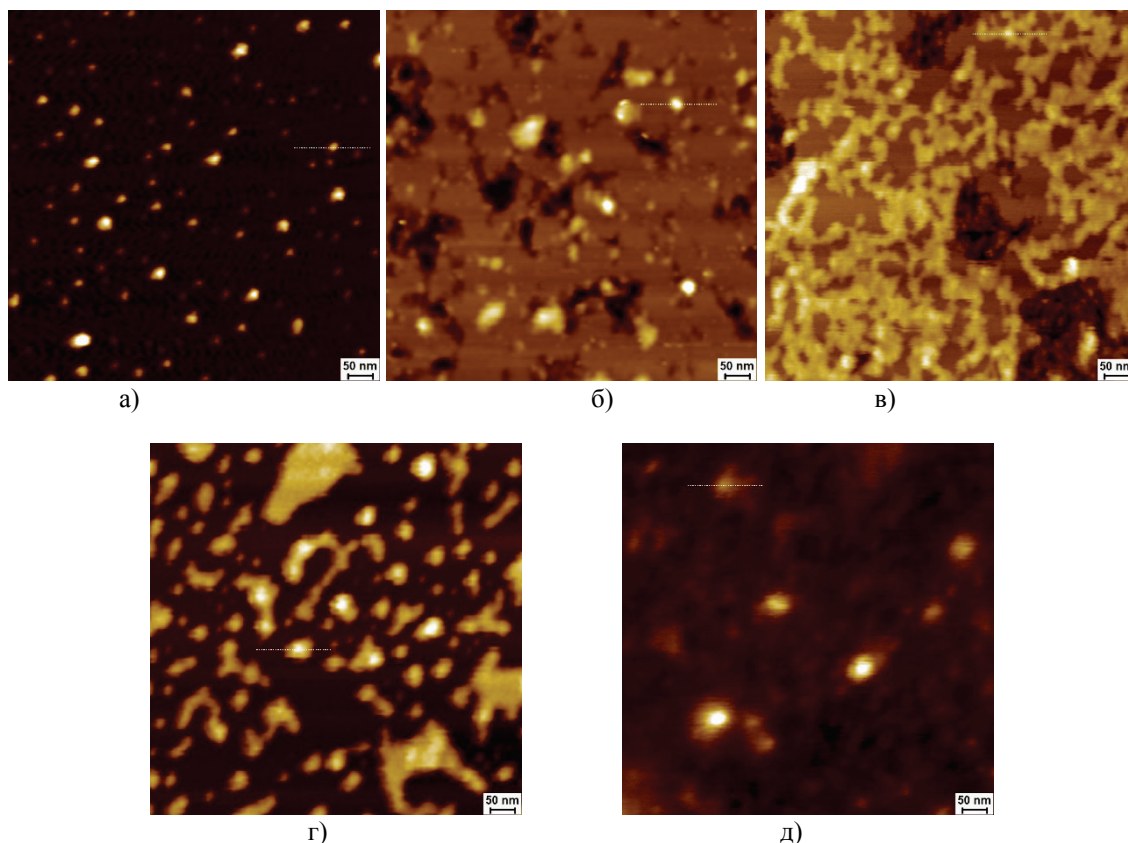


Рисунок 2. АСМ-изображения образцов белковых матриц, сформированных из препаратов изолированного порина *Y. pseudotuberculosis* (порин) и комплекса порин-ПГ (ПГ) в поддерживающем липидном бислое (SLB): а) слюда+SLB; б) слюда+SLB +порин; в) слюда + SLB+ ПГ; г) слюда + SLB+ ПГ, образец помечен КТ, приготовленными прямо на слюде; д) слюда + SLB + ПГ, образец помечен готовыми КТ. Белой пунктирной линией отмечены области измерения профилей единичных структур, приведенных на рисунке 3. Размер области изображения – 0,75х0,75 мкм

При проведении измерений методом флуоресцентной спектроскопии, оказалось, что интенсивность люминесценции полученных образцов существенно зависит от способа приготовления КТ и используемого препарата белка. В этой связи, для сравнительного анализа полученных данных, представленные на рисунке 4а спектры люминесценции были приведены к одному порядку интенсивности путем домножения величин интенсивности слабо люминесцирующих образцов. Коэффициент домножения указан на рисунке. Как следует данных рисунка 4 можно видеть, что наибольшей интенсивностью обладают образцы белка, полученные из бактерий *Y. pseudotuberculosis*: изолированный порин (YrOmpF) и его комплекс с ПГ (YrOmpF-ПГ), помеченные готовыми КТ CdS, привязанными карбодиимидом. В то же время, образец на основе изолированного порина из *Y. ruckeri* (YrOmpF), также помеченный готовыми КТ CdS, имеет существенно меньшую люминесценцию.

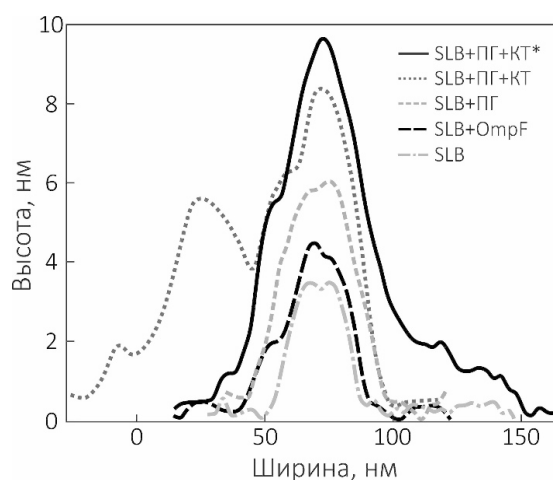


Рисунок 3. Профили единичных структур в массивах биоконъюгатов, состоящих из липидного слоя (SLB), функционализированного различными препаратами белка из *Y. pseudotuberculosis*, меченными КТ. Изолированный порин (OmpF) и комплекс OmpF-пептидогликан (ПГ). *отмечены КТ, синтезированные непосредственно в белковой матрице

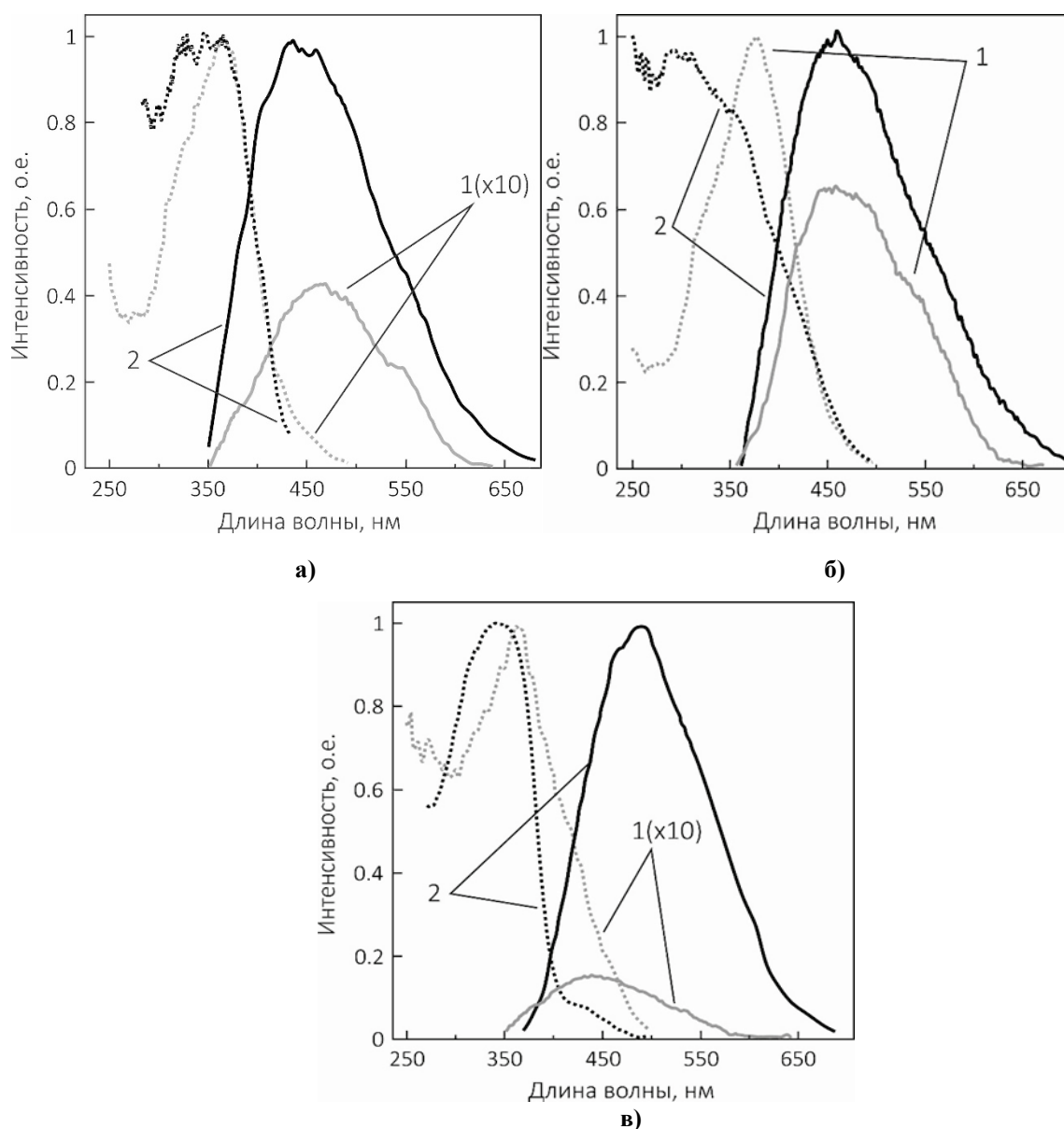


Рисунок 4. Спектры люминесценции (сплошная линия) и возбуждения люминесценции (штриховая линия) биоконъюгатов с КТ, приготовленными непосредственно в белковой матрице (1) и предварительно синтезированными (2): а) YpOmpF, б) YpПГ, в) YgOmpF.

Эти данные указывают на то, что даже такие высоко гомологичные по аминокислотной последовательности и подобных по пространственной организации белки, какими являются порины иерсиний, возможно, формируют отличные по структуре матрицы, что, в свою очередь, может сказываться на изменении оптических свойств используемых КТ в получаемых биоконъюгатах.

Достаточно четко выраженный длинноволновый максимум на спектрах возбуждения люминесценции соответствует 1S-1S переходу в КТ, что позволяет использовать его энергию для определения среднего размера КТ по методу эффективных масс [1]. Рассчитанные размеры КТ приведены в таблице 2.

Из представленных на рисунке 3 спектров возбуждения люминесценции, которые являются аналогами спектров оптического поглощения, можно видеть существенный сдвиг края фундаментального поглощения КТ (край фундаментального поглощения для сульфида кадмия составляет порядка 510 нм), зависящий от типа образца. При этом, для образцов КТ, синтезированных непосредственно в белковой матрице из препаратов порина из *Y. pseudotuberculosis*, максимум поглощения лежит в одном и том же спектральном диапазоне (380 нм), что указывает на формирование точек одинакового размера. Можно предположить, что в этом случае рост квантовых точек определяется степенью упорядоченности белковой сетчатой матрицы, размеры «ячеек» которой ограничивают размер квантовых точек.

В случае предварительно синтезированных КТ процесс их роста происходит по механизму Оствальдского созревания, согласно которому наночастицы стремятся к изотропному росту с образованием частицы со сферической формой, которые термодинамически более выгодны из-за минимизации общей поверхностной

Таблица 2. Средний диаметр квантовых точек, рассчитанный по методу эффективных масс электрона и дырки

Образец	Энергия перехода, эВ	Средний размер, нм
YrOmpF-ПГ*	3,40	3,10
YrOmpF-	3,57	2,90
YrПГ*	3,40	3,10
YrПГ	3,51	2,96
YrOmpF*	3,28	3,40
YrOmpF	3,22	3,60

*отмечены образцы, в которых КТ приготовлены непосредственно в белковой матрице.

энергии [8]. Диффузионная природа данного процесса делает весьма затруднительным прецизионный контроль размеров получаемых частиц, что может служить причиной существенного различия спектров оптического поглощения квантовых точек, полученных этим способом. Полученные результаты указывают на разные процессы роста квантовых точек в зависимости от способа получения конъюгатов.

Сравнительный анализ спектров поглощения и люминесценции (рис. 4) показывает, что все образцы биоконъюгатов, меченных КТ, полученные непосредственно в белковой матрице обладают достаточно большим Stokes shift люминесценции – не менее 70 нм или 0,55 эВ, что указывает на преимущественно дефектную природу их люминесценции [9]. При этом, образцы YrOmpF* и YrПГ*, обладающие одинаковым спектром поглощения имеют различный Stokes shift люминесценции – 0,55 и 0,73 эВ, соответственно. Одной из причин этого может быть различная природа дефектов поверхности КТ, например, избыток катиона или аниона, что позволяет ожидать различные сенсорные характеристики у данных типов биоконъюгатов. Конъюгаты на основе предварительно синтезированных КТ также имеют большой Stokes shift люминесценции, максимальное значение которого имеет образец YrOmpF, а его величина составляет 144 нм (1,03 эВ). При этом способе связывания КТ наименьший Stokes shift зарегистрирован у образца YrПГ и составляет 80 нм (0,67 эВ), что весьма близко к образцам КТ, синтезированным непосредственно в белковой матрице.

Таким образом, в результате проведенного исследования апробированы различные способы включения КТ в биоматрицы на основе пориновых белков, способных к образованию упорядоченных наноструктур в липидном бислое. Показано, что способ получения и состав белковой матрицы существенно влияют на оптические свойства КТ в биоконъюгатах. Обнаружено, что люминесценция КТ в составе полученных комплексов определяется большим количеством поверхностных дефектов, что представляет значительный интерес с точки зрения химической сенсорики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00318).

Список литературы/References:

1. Разумов В.Ф. Фундаментальные и прикладные аспекты люминесценции коллоидных квантовых точек. *Успехи физических наук*, 2016, т. 186, № 12, с. 1368-1376. [Razumov V.F. Fundamental and applied aspects of luminescence of colloidal quantum dots. *Advances Physical Science*, 2016, vol. 186, no. 2, pp. 1368-1376. (In Russ.)]
2. Wang Y., Herron N.J. Nanometer-sized semiconductor clusters: materials synthesis, quantum size effects, and photophysical properties. *Phys. Chem.*, 1991, vol. 95, no. 2, pp. 525 -532.
3. Rosenbusch J.P. Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecylsulfate binding. *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, pp. 8019-8029.
4. Новикова О.Д., Вакорина Т.Н., Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Ким Н.Ю., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Соловьева Т.Ф. Влияние условий культивирования на пространственную структуру и функциональную активность OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2008, т. 73, № 2, с. 173-184. [Novikova O.D., Vakorina T.I., Khomenko V.A., Likhatskaya G.N., Kim N.Yu., Emelyanenko V.I., Kuznetsova S.M., Solov'eva T.F. Influence of cultivation conditions on spatial structure and functional activity of OmpF like porin from outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry*, 2008, vol. 73, no. 2, pp. 173-184. (In Russ.)]
5. Garavito R.M., Rosenbusch J.P. Isolation and crystallization of bacterial porin. *Methods Enzymol*, 1986, vol. 125, pp. 309-328.
6. Qi Xiao, Chong Xiao. Surface-defect-states photoluminescence in CdS nanocrystals prepared by one-step aqueous synthesis method Applied Surface. *Science*, 2009, vol. 255, pp. 7111-7114.
7. Набережных Г.А., Карпенко А.А., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д. Получение упорядоченных структур бактериальных поринов в липидном бислое и исследование их морфологии методом

атомно-силовой микроскопии. *Биофизика*, 2019, т. 64, № 6, с. 1107-1114. [Naberezhnykh G.A., Karpenko A.A., Khomenko V.A., Solov'eva T.F., Novikova O.D. The formation of Ordered Structures of Bacterial Porins in a Lipid Bilayer and Analysis of Their Morphology by Atomic Force Microscopy. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 6, pp. 901-907.

8. Rempel A., Magerl A. Non-periodicity in nanoparticles with close-packed structures. *Acta Crystal. Section A*, 2010, vol. 6, no. 4, pp. 479-483.

9. Voznyy O. Mobile Surface Traps in CdSe Nanocrystals with Carboxylic Acid Ligands. *J. Phys. Chem. C*, 2011, vol. 115, no. 32, pp. 15927-15932.

BIO-CONJUGATION OF COLLOIDAL QUANTUM DOTS OF CADMIUM SULPHIDES AND SUPROMOLECULAR STRUCTURES OF PROTEIN-PORIN FROM BACTERIA OF THE GENUS YERSINIA. OBTAINING AND CHARACTERISTIC

Naberezhnykh G.A.¹, Sergeev A.A.², Portnyagina O.Yu.¹, Chistyulin D.K.¹, Sidorin E.V.¹, Novikova O.D.¹

¹ Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: naber1953@mail.ru

² Institute of Automation and Control Processes Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
Vladivostok, 690022, Russia

Abstract. Cadmium sulfide fluorescence quantum dots (QDs) are promising materials for optics, optoelectronics, biology, and medicine. In recent years, significant progress has been achieved in the use of nanomaterials to create biosensors, including based on protein structures ones. Among others, native or artificially constructed biosensors based on ion-conducting channels are a very promising class of nanostructures. In this work, various approaches were tested for the formation of ordered supramolecular structures of Yersinia porins (Yersinia pseudotuberculosis and Y. ruckeri) labeled with QDs: (1) conjugation of the porin matrix with stabilized QDs previously obtained and (2) QDs synthesis in a porin matrix with supporting lipid bilayer preformed on mica. The sizes of QDs and their conjugates with proteins were measured using the method of dynamic light scattering (directly in an aqueous suspension). The surface morphology of the samples was studied by atomic force microscopy. To characterize the optical properties of the obtained conjugates scanning fluorescence spectroscopy was used. It was found that the luminescence intensity of bioconjugates substantially depends on the method of QDs preparation and on protein sample used in matrix (isolated porin or the porin-peptidoglycan complex). It was shown that, depending on the matrix type, a shift in the fundamental absorption edge of QDs is observed. This indicates the formation of QDs of different diameters and, therefore, the possibility of controlling their sizes by varying the structure of the protein matrix. The data obtained open the prospect of using QDs labeled nanostructures based on bacterial porins as biosensors.

Key words: porin, cadmium sulfide, quantum dots, conjugation, luminescence.

СТРУКТУРА КОМПОЗИТНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ФИБРИНА И ГАЛАКТАНА КАРТОФЕЛЯ

Файзуллин Д.А., Валиуллина Ю.А., Сальников В.В.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН

ул. Лобачевского, 2, г. Казань, 420111, РФ; dfaizullin@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.07.20

Аннотация. Композитные белок-полисахаридные гидрогели находят применение при разработке средств доставки и в регенеративной медицине благодаря дешевизне сырья, биосовместимости, малотоксичности и собственной биологической активности компонент. В работе исследована возможность получения композитных гидрогелей с использованием слабозаряженного нежелирующего полисахарида галактана картофеля и гель-образующего белка фибриногена. Результаты проведенного исследования показывают, что фибриноген связывается с галактаном, сохраняя способность к энзиматической полимеризации. Образующиеся композитные гидрогели состоят из волокон фибрина с включенными в них глобулярными частицами полисахарида и по сравнению с чистым фибрином характеризуются большей плотностью, упругостью и устойчивостью к лизису, что делает их перспективными материалами для биотехнологического и биомедицинского применения.

Ключевые слова: белок-полисахаридные гидрогели, фибрин, галактан картофеля.

ВВЕДЕНИЕ

Композитные гидрогели на основе белков и полисахаридов являются предметом многолетнего интереса исследователей, поскольку находят применение в области разработки средств доставки лекарств и в регенеративной медицине для замены и лечения тканей и органоклеточной терапии [1-3]. Это связано с биосовместимостью гидрогелей и сходством их физических свойств с натуральными тканями. Композитные гидрогели предоставляют возможность регулировать в широких пределах функциональные свойства создаваемых систем путем вариации соотношения компонент и химической модификации входящих в их состав макромолекул. Однако биомедицинское применение гидрогелей часто затруднено токсичностью сшивающих агентов и ограничениями в формировании гидрогелей в физиологических условиях, что сохраняет актуальность поиска новых комбинаций для их создания.

Белок-полисахаридные гидрогели на основе гелеобразующих белков коллагена, фибрина или желатина используются для восстановления поврежденных тканей кожи, хрящей, сухожилий, сердца, мышц, глаз и других органов [4-7]. Широкий спектр их применения связан с уникальными свойствами этих белков – они позволяют создавать трехмерные структуры с различной архитектурой и функциями. Полученные материалы имеют высокий уровень гидратации, пористости, обеспечивая как обширную площадь поверхности для адгезии клеток, так и условия, необходимые для поддержания их жизнеспособности, миграции и пролиферации [5, 7-9]. Привлекательность этих белков с точки зрения тканевой инженерии является результатом наличия активных центров взаимодействия с клеточными интегринами, которые остаются доступными и после полимеризации [10, 11].

Использование заряженных полисахаридов в качестве второго компонента гидрогелей упрощает технологию их получения, но неблагоприятно сказывается на токсичности и стабильности в организме вследствие существенных электростатических взаимодействий с окружением. Поэтому предпочтительно использование нейтральных полисахаридов. Превосходными желирующими свойствами в сочетании с низкой стоимостью и биологической активностью обладают пектины, состоящие из смеси полигалактуроновой кислоты и рамногалактуронанов I и II [12]. Пектины желируют в присутствии ионов Ca^{2+} или при низких значениях pH за счет образования упорядоченных структур полигалактуроновой кислоты. Удаление или модификация кислотных остатков лишает пектины желирующих свойств. Выход из положения видится в оптимальном сочетании нейтральных или слабозаряженных компонент пектина с гелеобразующими белками. В данной работе исследованы свойства композитных гидрогелей на основе фибрина и галактана картофеля. Последний представляет собой продукт энзиматического гидролиза рамногалактуронана I картофеля, и состоит из остова с чередующимися остатками галактуроновой кислоты и рамнозы и боковых, преимущественно галактановых, цепей различной длины. Химический состав галактана картофеля, согласно спецификации производителя, включает 87% галактозы, 3% арабинозы, 4% рамнозы и 6% галактуроновой кислоты. Галактан картофеля до сих пор не был исследован в качестве компонента гелей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы.

Фибриноген из бычьей плазмы (Фб) (Calbiochem); тромбин из бычьей плазмы (Тб) (Sigma); трипсин из поджелудочной железы свиньи (Sigma); галактан картофеля (ГК) (Megazyme, Lot 120501c).

Исходные растворы Фб и ГК готовили в буфере 1 (20 мМ Трис-НСl с 150 мМ NaCl, pH 7.4) или в буфере 2 (5 мМ Трис-НСl с 30 мМ NaCl, pH 7.4), тромбин и трипсин растворяли в буфере 1.

Приготовление растворов.

Коммерческий лиофилизированный порошок Фб растворяли в 0.9% водном растворе NaCl при 37°C и переводили в буфер 1 или буфер 2 используя колонки для обессоливания Zeba 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Концентрацию Фб в растворах определяли в кювете толщиной 1 см, используя коэффициент экстинкции 1,51 ($\lambda = 280$ нм, 1 мг/мл). Тб в концентрации 133 НИН растворяли в буфере 1. Исходные растворы Фб и Тб разделяли на аликвоты по 1 мл, замораживали в жидком азоте и хранили при -18°C до использования. Трипсин в концентрации 1мМ и ГК в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 вес% растворяли в соответствующем буфере непосредственно перед измерениями.

Микрогравиметрия.

Измерение проводили с помощью кварцевых микровесов QCM-200 (SRS, США). Использовали кварцевые резонаторы 5 МГц с золотым покрытием. Исследуемый раствор Фб или смесь Фб/ГК наносили на поверхность электрода кварцевого резонатора. Конечные концентрации Фб и ГК составляли 0,5 и 1 мг/мл, соответственно. Образование фибринового сгустка инициировали внесением тромбина. Конечная концентрация Тб составляла 0,52 НИН. Об адсорбции компонент на поверхности электрода и кинетике полимеризации судили по изменению частоты колебаний резонатора. Величина адсорбированной массы связана с частотой резонатора соотношением: $\Delta F = -C \cdot \Delta m$, где $C = 56,6$ Гц мкг⁻¹ см².

Турбидиметрия.

Кинетику полимеризации и лизис фибрина исследовали с помощью метода турбидиметрии [13] с использованием спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer). Исходный раствор Фб, приготовленный в буфере 1, смешивали 1:1 с буфером 1 (контроль) или с ГК в кювете спектрофотометра, инкубировали 30 мин при 25°C и добавляли Тб. Конечные концентрации Фб и Тб составляли 0,5 мг/мл и 0,26 НИН, соответственно. Конечные концентрации ГК – 0,1, 0,5 и 1 вес.%. Формирование сгустка регистрировали по увеличению оптической плотности на длине волны 350 нм в течение 1 часа. Лизис фибрина инициировали, распределяя 10 мкл исходного раствора трипсина по поверхности сгустка. Измеряли следующие параметры, характеризующие кинетику полимеризации фибрина: лаг-период, максимальная скорость реакции и максимальная оптическая плотность при выравнивании кинетики (уровень плато) [14].

Динамическое светорассеяние.

Дзета-потенциал и гидродинамический диаметр частиц в смесях Фб/ГК измеряли на спектрометре Zetasizer Nano (Malvern Panalytical Ltd.). Применяли буфер 2 с пониженным содержанием соли для уменьшения джоулева нагрева и деструкции электродов [15]. Буфер фильтровали через PTFE фильтры с диаметром отверстий 0,22 мкм. Готовили растворы Фб с концентрацией 0; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1 мг/мл и постоянной концентрацией ГК. Исследуемые растворы инкубировали в течение 30 минут при 25°C, центрифугировали в течение 10 минут при 10000 G и отбирали 700 мкл супернатанта в капиллярную U-кювету в соответствии с имеющимися рекомендациями [15, 16]. Концентрация ГК – 0,1 вес%. Каждое значение данных представляет собой среднее из трех измерений.

Сканирующая электронная микроскопия.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) гидрогели готовили, добавляя Тб в раствор Фб или в смесь Фб/галактан. Конечные концентрации Тб, Фб и галактана составляли 0,26 НИН, 1 мг/мл и 1 вес%, соответственно. Фибриновые гели формировали в течение 1 часа при 22°C и затем трижды промывали избытком буфера в течение 15 минут. Промытые гели фиксировали в 2% глutarовом альдегиде в течение 1 часа, промывали водой и дегидратировали в возрастающих концентрациях этанола. Затем образцы погружали на 3 мин в 100% HMDS и избыток HMDS удаляли на фильтровальной бумаге. Гели исследовали на сканирующем электронном микроскопе Auriga Cross Beam (Carl Zeiss, Германия) в «Казанском национальном исследовательском техническом университете им. А.Н. Туполева-КАИ» (КНИТУ-КАИ).

Статистический анализ.

Статистический анализ и аппроксимацию зависимостей проводили с использованием Origin 8.6 (OriginLab, MA, США). Определяли среднее по трем измерениям и среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным СЭМ, гель на основе чистого фибрина имеет рыхлую структуру из длинных слабовеетвящихся волокон со средним диаметром 80 ± 20 нм (рис. 1А). В присутствии 1 вес% ГК образуется более плотная структура из тонких сильноветвящихся волокон диаметром 50 ± 12 нм (Рисунок 1Б). Пространственная структура геля неоднородна: тонкие волокна объединены в более толстые тяжи с широкими порами между ними. Молекулы полисахарида включены в структуру волокон геля в виде компактных частиц диаметром $20 \div 40$ нм. Включение ГК в структуру волокон фибрина возможно при связывании ГК с молекулами мономерного Фб, которые после полимеризации удерживают частицы полисахарида.

Взаимодействие Фб с ГК в растворе исследовали методом динамического светорассеяния. На рисунке 2а представлена зависимость гидродинамического диаметра частиц в растворе ГК при добавлении возрастающего количества Фб, а на рисунке 2б – аналогичная зависимость для дзета-потенциала.

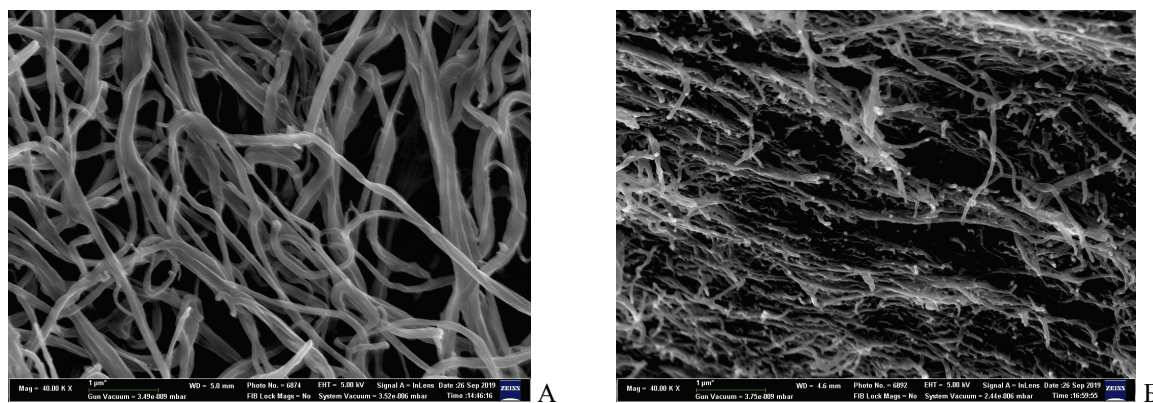


Рисунок 1. Морфология фибриновых гелей. А – контроль, чистый фибрин; Б – композит фибрин/галактан картофеля. Сканирующая электронная микроскопия, увеличение 40К

Чистый ГК присутствует в растворе в виде частиц с эффективным диаметром 8 нм, несущими отрицательный заряд, что следует из отрицательного значения дзета-потенциала и является следствием присутствия небольшого количества остатков галактуроновой кислоты в молекуле полисахарида. При добавлении Фб наблюдается рост размеров частиц и дзета-потенциала с выходом на насыщение при концентрации Фб $> 0,3$ мг/мл. В итоге, эффективный диаметр частиц увеличивается более чем в 2 раза, а дзета-потенциал становится менее отрицательным, что свидетельствует о связывании молекул Фб с частицами ГК. Можно предположить, что включение частиц полисахарида в структуру волокон фибрина должно отразиться на механических свойствах геля. Для оценки этого эффекта мы исследовали процесс полимеризации фибрина в присутствии ГК методом кварцевых микровесов, позволяющим сравнить величину массы вещества, сцепленной с поверхностью электрода, с величиной энергетических потерь на возбуждение колебаний в этой массе [17].

На рисунке 3 представлен временной ход полимеризации и образования геля в растворе чистого Фб. После добавления тромбина (отмечено стрелкой) происходит процесс понижения частоты F резонатора, эквивалентный росту сцепленной с резонатором массы и одновременно растет величина коэффициента потерь R. Соотношение между этими величинами характеризует механические свойства образующегося геля [18], что отражено на рисунке 4. Начальный пологий участок зависимостей, регистрируемый в течение времени инкубации смеси над кристаллом, соответствует адсорбции компонент раствора на поверхности электрода. В смесях Фб+ГК сдвиг частоты больше, чем в чистом Фб, что указывает на большую адсорбированную массу. В течение нескольких минут после добавления тромбина в обеих системах наблюдаются небольшое, но резкое увеличение величины ΔR , свидетельствующее о реорганизации адсорбированного слоя. Затем, на зависимости для чистого Фб формируется протяженный линейный участок, указывающий на скоррелированные изменения ΔR и ΔF , что связано с образованием однородной пространственной сети фибрина. Угол наклона зависимости пропорционален вязкости прилежащего к резонатору слоя фибрина. В смеси Фб+ГК угол наклона меньше, что соответствует более упругому слою [19-21].

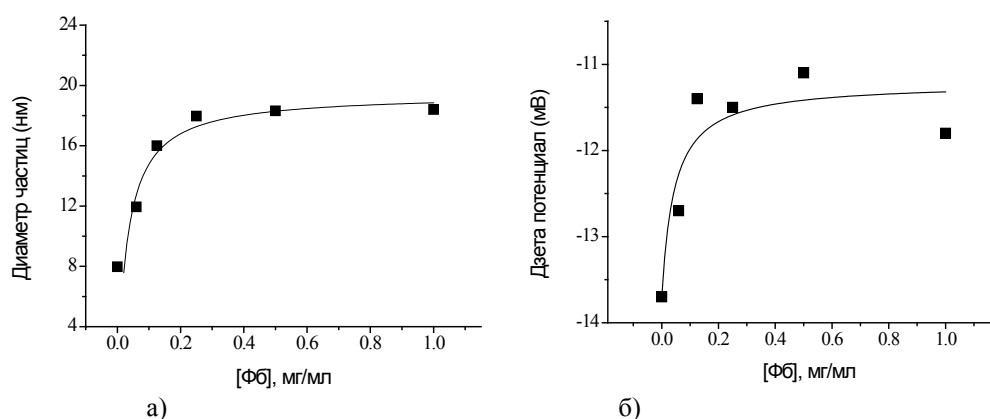


Рисунок 2. Зависимость размера (а) и дзета-потенциала (б) частиц ГК от концентрации фибриногена. Параметры аппроксимации изотермой Ленгмюра: а) $V_{\max} = 19,4 \pm 7,7$ нм, $k = 0,031 \pm 0,008$ мг/мл; б) $V_{\max} = -11,2 \pm 4,2$ мВ, $k = 0,044 \pm 0,031$ мг/мл

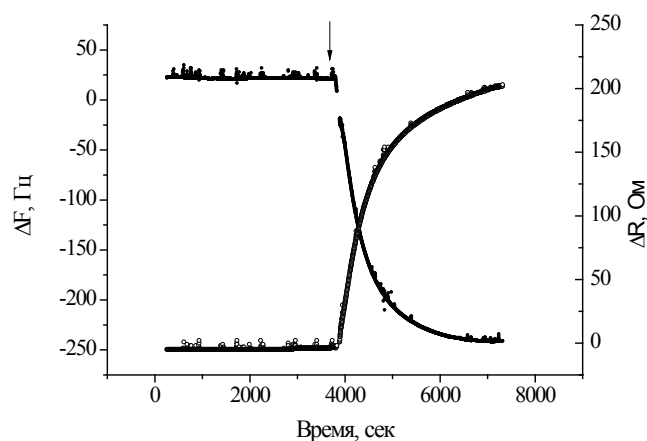


Рисунок 3. Кинетика изменений частоты ΔF (крестики, левая шкала) и эквивалентного сопротивления потерь ΔR (кружки, правая шкала) при полимеризации чистого Фб

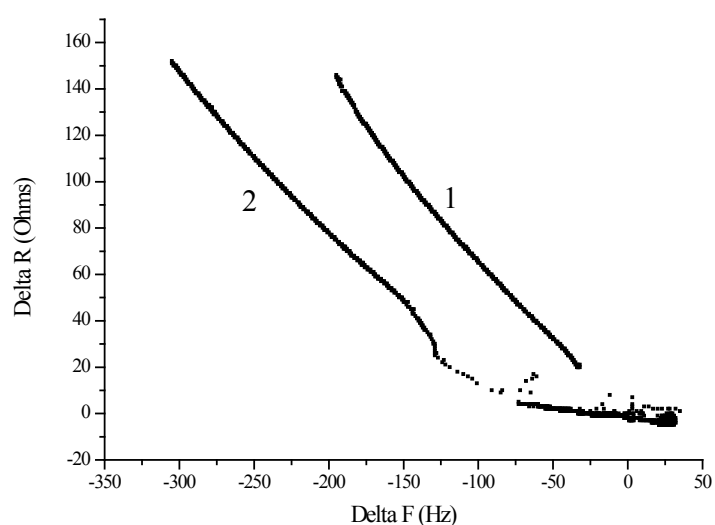


Рисунок 4. Соотношение между приростом частоты ΔF и сопротивления ΔR при адсорбции и полимеризации Фб (кривая 1) и Фб+РГ (кривая 2)

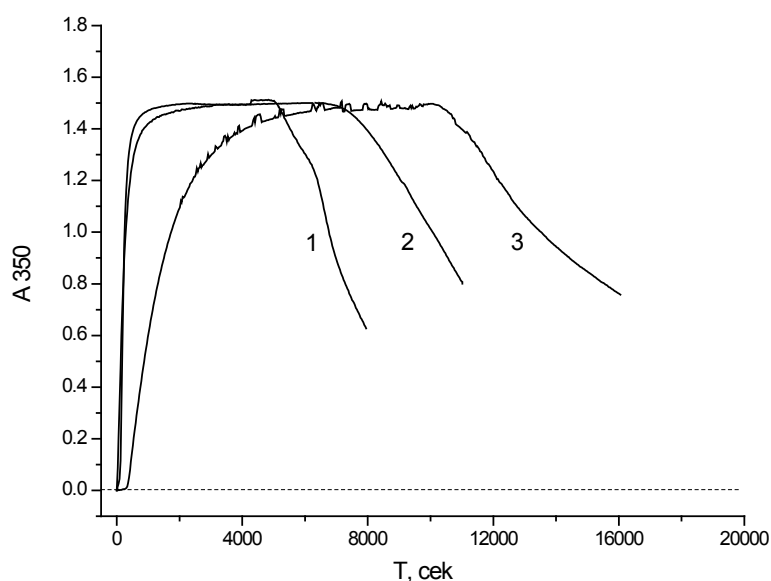


Рисунок 5. Нормированные кинетические кривые фибринообразования и последующего гидролиза в контроле (чистый Фб, 1) и в присутствии ГК 0,1% (2) и 1% (3)

Таблица 1. Параметры кинетики образования и лизиса фибрина в присутствии ГК

	Лаг период	Скорость свертывания	Уровень плато	Скорость лизиса
	Δt , сек	$V_{\max}$, 10^{-4} сек^{-1}	$H_{\max}$	$V_{\max}$, 10^{-4} сек^{-1}
Фибрин 1 мг/мл	50 ± 10	$17,15 \pm 1,7$	$0,11 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,1$
Фибрин/ ГК 0,1 вес%	62 ± 10	$19,4 \pm 2,8$	$0,37 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,1$
Фибрин/ ГК 0,5 вес%	257 ± 10	$10,6 \pm 2$	$1,48 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$
Фибрин/ ГК 1 вес%	516 ± 10	$6,1 \pm 2$	$1,42 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,4$

Влияние ГК на скорость полимеризации фибрина и последующего гидролиза под действием трипсина изучали методом турбидиметрии (рис. 5). Приведенные на рисунке зависимости нормированы на максимум рассеяния, чтобы нагляднее выявить различия во временном ходе процессов. Из зависимостей определяли следующие параметры: длительность лаг-периода, соответствующую времени образования мономеров фибрина и их ассоциации в протофибриллы; максимальную скорость полимеризации $V_{\max}$, определяемую как повышение оптической плотности в единицу времени и характеризующую формирование фибриновых волокон; максимальную оптическую плотность на плато, $H_{\max}$, отражающую толщину и число волокон в единице объема [14] (табл. 1). Там же приведены значения скорости $V_{\max}$ лизиса образовавшегося сгустка под действием трипсина.

Из данных таблицы 1 следует, что присутствие ГК модифицирует все ключевые стадии полимеризации концентрационно-зависимым образом: удлиняется лаг-период и уменьшается скорость роста светорассеяния, увеличивается предельный уровень рассеяния на плато (увеличивается эффективная толщина волокон геля). Гель, сформированный в присутствии ГК, более устойчив к действию протеазы трипсина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показывают, что Фб связывается с ГК, сохраняя способность к энзиматической полимеризации. Образующиеся композитные гидрогели состоят из волокон фибрина с включенными в них глобулярными частицами полисахарида, характеризуются более высокой плотностью волокон в объеме, упругостью и устойчивостью к лизису по сравнению с чистым фибрином, что делает их перспективными для биотехнологического и биомедицинского применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке совместного проекта РФФИ и Правительства Республики Татарстан № 18-415-160011

Список литературы / References:

- Karfeld-Sulzer L.S., Siegenthaler B., Ghayor C., Weber F.E. Fibrin Hydrogel Based Bone Substitute Tethered with BMP-2 and BMP-2/7 Heterodimers. *Materials*, 2015, vol. 8, pp. 977-991. DOI: 10.3390/ma8030977.
- Yahia L.H. History and Applications of Hydrogels. *J. Biomed. Sci.*, 2015, vol. 4, pp.1-23.
- Velema J., Kaplan D. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2006, vol. 102, pp. 187-238. DOI: 10.1007/10_013.
- Silva A.K., Richard C., Bessodes M., Scherman D., Merten O.W. Growth factor delivery approaches in hydrogels. *Biomacromolecules*, 2009, vol. 10, pp. 9-18.
- Hubbell J.A. Materials as morphogene guides in tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, vol. 14, pp. 551-558.
- de la Puente P., Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp. Cell Res.*, 2014, vol. 322, pp. 1-11. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.12.017.
- Dong C., Lv Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. *Polymers*, 2016, vol. 8, p. 42. DOI: 10.3390/polym8020042.
- Rajangam T., An S.S.A. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. *Int. J. Nanomed.*, 2013, vol. 8, pp. 3641-3662. DOI: 10.2147/IJN.S43945.
- Noori A., Ashrafi S.J., Vaez-Ghaemi R., Hatamian-Zaremi A., Webster T.J. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int. J. Nanomed.*, 2017, vol. 12, pp. 4937-4961. DOI: 10.2147/IJN.S124671.
- Davidenko N., Schuster C.F., Bax D.V., Farndale R.W. et al. Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2016, vol. 27, p. 148. DOI: 10.1007/s10856-016-5763-9.
- Laurens M., Engelse M.A., Jungerius C., Löwik C.W., van Hinsbergh V.W., Koolwijk P. Single and combined effects of $\alpha 5 \beta 1$ - and $\alpha 5 \beta 3$ -integrins on capillary tube formation in a human fibrinous matrix. *Angiogenesis*, 2009, vol. 12, pp. 275-285. DOI: 10.1007/s10456-009-9150-8.
- Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K., Rao M.A. Chemistry and uses of pectin - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1997, vol. 37, no. 1, pp. 47-73. DOI: 10.1080/10408399709527767.

13. Hantgan R.R., Hermans J. Assembly of fibrin. A light scattering study. *J Biol Chem*, 1979, vol. 254, pp. 11272-11281.
14. Weisel J.W., Nagaswami C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J.*, 1992, vol. 63, pp. 111-128.
15. Smith M.C., Crist R.M., Clogston J.D., McNeil S.E. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*, 2017, vol. 409, pp. 5779-5787.
16. Nakatuka Y., Yoshida H., Fukui K., Matuzawa M. The effect of particle size distribution on effective zeta-potential by use of the sedimentation method. *Adv Powder Technol*, 2015, vol. 26, pp. 650-656.
17. Reviakine I., Johannsmann D., Richter R.P. Hearing what you cannot see and visualizing what you hear—interpreting quartz crystal microbalance data from solvated interfaces. *Anal Chem*, 2011, vol. 83, pp. 8838-48. DOI: 10.1021/ac201778h.
18. Dixon M.C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *Journal of biomolecular techniques*, 2008, vol. 19, pp. 151-158.
19. Wang X., Ruengruglikit C., Wang Y., Huang Q. Interfacial interactions of pectin with bovine serum albumin studied by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: Effect of ionic strength. *J Agric Food Chem*, 2007, vol. 55, pp. 10425-10431.
20. Marxer C.G., Coen M.C., Greber T., Greber U.F., Schlapbach L. Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes. *Anal Bioanal Chem*, 2003, vol. 377, pp. 578-586. DOI: 10.1007/s00216-003-2080-1.
21. Marxer C.G., Coen M.C., Bissig H. et al. Simultaneous measurement of the maximum oscillation amplitude and the transient decay time constant of the QCM reveals stiffness changes of the adlayer. *Anal Bioanal Chem*, vol. 377, pp. 570-577. DOI: 10.1007/s00216-003-2081-0.

STRUCTURE OF COMPOSITE HYDROGELS BASED ON FIBRIN AND POTATO GALACTAN

Faizullin D.A., Valiullina Yu.A., Salnikov V.V.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS
Lobachevsky st. 2/31, Kazan, 420111 Russia; e-mail: dfaizullin@mail.ru

Abstract. Composite protein-polysaccharide hydrogels are used in the development of delivery systems and in regenerative medicine for the replacement and treatment of tissues and organocellular therapy due to the cheapness of raw materials, biocompatibility, low toxicity, and intrinsic biological activity of the components. In this work, the possibility of obtaining composite hydrogels based on the weakly charged non-gelling polysaccharide galactans from potatoes and the gel-forming protein fibrinogen was investigated. The results of the study show that fibrinogen binds to galactan, preserving the ability to enzymatic polymerization. The resulting composite hydrogels consist of fibrin fibers with polysaccharide globular particles incorporated into them, and characterized by a higher density, elasticity, and resistance to lysis as compared to pure fibrin, which makes them promising for biotechnological and biomedical applications.

Key words: protein-polysaccharide hydrogels, fibrin, potato galactan.

РОЛЬ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МЕХАНИЗМАХ ПАТОГЕНЕЗА ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ

Внуков В.В.¹, Кролевец И.В.², Плотников А.А.¹, Ананян А.А.¹, Колесников М.А.³,
Милютина Н.П.¹

¹ Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского
ул. Стачки 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: natmilut@rambler.ru

² Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ
Нахичеванский пер., 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, РФ

³ Городская клиническая больница № 2
ул. Балакирева, 5, г. Ставрополь, 355018, РФ

Поступила в редакцию: 25.07.20

Аннотация. В работе исследовали уровни оксида азота, провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α), лептина и мочевой кислоты в плазме крови и синовиальной жидкости (СЖ) как биомаркеров посттравматического гонартроза (ПТГА), а также их ассоциацию с рентгенологической стадией ПТГА. Установлено, что у пациентов с ранними и поздними стадиями посттравматического артроза коленного сустава повышен уровень циркулирующих провоспалительных медиаторов: нитритов/нитратов (NOx-), IL-6 и мочевой кислоты по сравнению со здоровыми лицами. Циркулирующие уровни NOx-, IL-1 β , IL-6, мочевой кислоты, лептина и комбинации IL-6 и лептина могут быть потенциальными диагностическими тестами в соответствии с результатами ROC-анализа. Уровни NOx-, IL-6, IL-18 и лептина в плазме достоверно коррелировали с их содержанием в СЖ. Тяжесть ПТГА коррелировала с уровнем лептина в плазме и СЖ, а также с уровнем синовиального IL-18. Исследована ассоциация полиморфных вариантов генов *nNOS* и *eNOS* с риском развития посттравматического гонартроза (ПТГА) у жителей Ростовской области. Установлено, что аллель -84A полиморфного гена *nNOS* ассоциирован с риском развития ПТГА.

Ключевые слова: посттравматический гонартроз, плазма крови, синовиальная жидкость, оксид азота, провоспалительные цитокины, лептин, гены NO-синтаз

Остеоартроз (ОА) – гетерогенная группа заболеваний различной этиологии, имеющая сходные биологические, морфологические и клинические проявления и исход, в основе которых лежит поражение всех компонентов сустава, в первую очередь – хряща, а также субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы и периартикулярных мышц [1, 2]. Ключевые события, происходящие при развитии ОА, включают дисбаланс анаболического и катаболического сигналов, управляемых цитокиновыми каскадами, повышенная продукция медиаторов воспаления и окислительный стресс [3, 4]. Важная роль в патогенезе ПТГА принадлежит оксиду азота (NO $\bullet$), который способствует развитию нитрозильной составляющей окислительного стресса и воспаления при дегенеративных заболеваниях суставов [5]. Известно, что при ОА хондроциты наряду с провоспалительными медиаторами генерируют оксид азота (NO $\bullet$), сверхпродукция которого осуществляется, главным образом, индуцибельной NO-синтазой [6,7]. В итоге, развитие нитрозильного стресса при артрозе как в тканях сустава, так и в крови способствует интенсификации программируемой клеточной гибели хондроцитов хрящевой ткани сустава и лейкоцитов периферической крови [8].

Высоко значимым фактором риска развития артроза является травма, которая способна инициировать процесс воспаления в тканях сустава, приводить к прогрессирующей дегенерации хряща и развитию посттравматического артроза [9]. В исследованиях [10, 11] показана роль полиморфных маркеров различных генов в предрасположенности к артрозу, в том числе, к посттравматическому гонартрозу.

Цель работы – исследование роли оксида азота и провоспалительных цитокинов как потенциальных биомаркеров прогрессирования посттравматического гонартроза (ПТГА), а также оценка полиморфизма гена нейрональной NO-синтазы (*NOS1*) в качестве предиктора предрасположенности к развитию ПТГА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 134 пациентов с диагнозом ПТГА и 37 здоровых лиц (контроль). Все пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от стадии ПТГА по шкале Kellgren–Lawrence (K/L) – ранние стадии по K/L ≤ 2 (1 группа), поздние стадии по K/L ≥ 3 (2 группа). Характеристика пациентов с ПТГА и здоровых лиц представлена в таблице 1.

Кровь (10 мл) отбирали в утренние часы натощак из локтевой вены в стерильные пробирки с K₂-ЭДТА в качестве антикоагулянта, получали плазму крови. Синовиальную жидкость (СЖ) отбирали в стерильные пробирки с гепарином путем артроцентеза коленного сустава, далее центрифугировали; супернатант использовали для биохимического анализа.

Таблица 1. Характеристика пациентов с ПТГА и здоровых лиц

Характеристика	Здоровые доноры (n=37)	ПТГА	p^*	ПТГА, подгруппы	
		Общая группа (n=134)		К/Л 1–2 (n = 103)	К/Л 3–4 (n = 31)
Возраст (годы)	40,19±10,11	43,63 ± 15,14	0,26	40,88±14,92	52,77±12,15
Пол (м/ж)	15/22	60/74	0,65	50/53	10/21
ИМТ (кг/м ²)	26,07 ± 2,63	28,15 ± 5,59	0,15	28,18 ± 6,0	28,05±4,16

Демографические данные представлены как $M \pm SD$

* значение p для сравнения здоровых лиц и пациентов с ПТГА

ИМТ - индекс массы тела

В качестве провоспалительных медиаторов в плазме крови и синовиальной жидкости (СЖ) определяли содержание оксида азота по уровню нитритов/нитратов (NOx), а также уровни лептина, IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α , мочевой кислоты. Уровни цитокинов и лептина измеряли с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (ELISA) - для IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α (Vector-Best, Россия), для лептина (Leptin-DRG, США) в соответствии с инструкциями производителей.

Определение общего содержания нитритов/нитратов (NOx-) в плазме и СЖ проводили колориметрическим методом, основанном на реакции Грисса [12], с использованием спектрофотометра Beckman Coulter DU 800 (USA). Концентрацию мочевой кислоты (МК) определяли колориметрическим методом («Витал», Россия).

В группу для генотипирования SNP-локусов были включены 184 пациента с ПТГА (возраст 44,7±1,1 лет; 84 мужчин/100 женщин; ИМТ 28,1±0,54 кг/м²). В контрольную группу для SNP-типирования было включено 113 человек (возраст 42,1±1,5 лет; 50 мужчин/63 женщины; ИМТ 25,5±0,58 кг/м²) без признаков ПТГА в анамнезе, что было подтверждено рентгенологическим методом. Все обследованные пациенты имели русскую национальность и проживали на территории Ростовской области.

Для идентификации полиморфных аллелей генов *nNOS* и *eNOS* использовали ПЦР с последующей электрофоретической детекцией в агарозном геле. В исследовании были использованы диагностикумы «SNP-экспресс» (Литех, Москва). Пробы с замороженными при -30°C форменными элементами крови использовали для выделения ДНК с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех). Анализ электрофореграмм осуществляли под ультрафиолетом ($\lambda = 310$ нм) на трансиллюминаторе BioRad (США).

Статистический анализ проводился в пакетах программ Statistica 6.1 и SPSS 23.0. Критерий Колмогорова-Смирнова показал, что распределение данных отличается от нормального, поэтому для сравнения уровней провоспалительных медиаторов использовали непараметрические критерии Краскела-Уоллеса и *U*-тест Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического рангового коэффициента корреляции Спирмена (r). Логистическая регрессия проводилась для анализа влияния полиморфных локусов генов *NO*-синтаз на предрасположенность к развитию ПТГА, с расчетом отношений шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI). Оценку диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических кривых (ROC-анализ) [13]. Данные представлены как медиана (25-75% квартили) или частоты генотипов (%). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования потенциальных биомаркеров для диагностики артроза все еще находятся на переднем крае исследований [6]. Однако биомаркеры прогрессии ПТГА изучены в значительно меньшей степени. Основные выводы данного исследования заключаются в том, что некоторые циркулирующие биомаркеры, а именно уровень нитритов/нитратов, комбинация IL-6 и лептина, а также IL-1 β , могут использоваться для прогнозирования возникновения ПТГА (ранний ПТГА в случае IL-1 β). Уровни лептина в плазме и СЖ и уровень IL-18 в СЖ связаны с прогрессированием ПТГА.

Проведенное исследование показывает, что при ПТГА в плазме крови и синовиальной жидкости резко возрастает содержание провоспалительных медиаторов с наибольшим отличием от контроля в СЖ. Причем, уровни нитритов/нитратов, IL-1 β , IL-6, мочевой кислоты и лептина в плазме крови значительно различались у пациентов с ранней и поздней стадиями ПТГА относительно контрольной группы (табл. 2). В то же время уровни этих медиаторов в СЖ были высокими, начиная с ранней стадии ПТГА. Уровни NOx-, IL-6, IL-18 и лептина в плазме достоверно коррелировали с их содержанием в синовиальной жидкости: $r = 0,585$, $p < 0,00001$; $r = 0,457$, $p = 0,0015$; $r = 0,299$, $p = 0,044$; $r = 0,864$, $p < 0,00001$, соответственно. Как и ожидалось, было установлено, что ИМТ пациентов с ПТГА тесно коррелирует с уровнями лептина в плазме ($r = 0,723$, $p < 0,000001$) и СЖ ($r = 0,604$, $p = 0,0003$).

В ряде исследований предполагается, что для предотвращения развития ПТГА в поврежденных коленных суставах необходимо нейтрализовать провоспалительные цитокины, такие как IL-6, IL-8 и IL-1 β [7, 14]. Повышенные уровни IL-6 и IL-8 наблюдались после повреждения передней крестообразной связки [15]. Полученные результаты показывают, что уровень IL-6 в плазме и СЖ был значительно выше у пациентов с ранней и поздней стадиями ПТГА, чем у здоровых лиц.

Таблица 2. Содержание провоспалительных медиаторов в плазме крови пациентов с ПТГА и здоровых лиц

Показатель	Контроль	ПТГА			<i>p</i>
		Общая группа	К/Л 1-2	К/Л 3-4	
NO _x (µM/л)	15,81 (15,47-17,11)	23,88 (22,17 - 29,63)	23,88 (22,35 - 29,58)	24,26 (15,33 - 30,1)	<0,0001
IL-1β (пг/мл)	0,85 (0,5-1,4)	1,25 (1,0 - 1,7)	1,4 (1,1 - 1,7)	1,2 (1,0 - 1,3)	<0,0185
IL-6 (пг/мл)	1,29 (0,89-1,78)	2,75 (1,22 - 6,0)	3,13 (1,44 - 6,42)	2,22 (1,22 - 4,67)	<0,0001
IL-18 (пг/мл)	147,0 (113,0-209,0)	138,17 (88,0 - 186,0)	147,17 (88,0 -196,0)	113,63 (83,5 -140,17)	<0,50
TNFα (пг/мл)	2,29 (1,0-3,43)	0,71 (0 -2,43)	0,43 (0 - 1,43)	2,21 (0,36 -5,93)	<0,111
МК (µM/л)	218,51 (196,5-280,03)	344,99 (265,93 - 428,47)	355,18 (252,6 - 439,39)	329,69 (280,87 - 362,35)	<0,0017
Лептин (нг/мл)	1,85 (1,26-8,50)	5,81 (1,76 -19,19)	4,32 (1,71 - 13,13)	12,94 (4,36 - 23,0)	<0.0346

Данные представлены в виде медианы (25%; 75% квантили). Значения *p*, выделенные жирным шрифтом, являются статистически значимыми (*p* < 0,05).

Было обнаружено, что циркулирующий IL-1β ассоциируется с ранней стадией ПТГА даже после корректировки по возрасту, полу и ИМТ (табл. 2). Это согласуется с результатами исследования [16], в котором IL-1β, по-видимому, не играл заметной роли в конечной стадии ОА, и исследованием [17], в котором более высокая синовиальная экспрессия IL-1β наблюдалась у пациентов с менее тяжелым ОА (оценка по К/Л 2-3 против К/Л 4). Концентрации IL-1β и IL-6 в СЖ были выше у пациентов с острым повреждением коленного сустава, чем базальные уровни данных цитокинов [15].

В процессе исследования не было обнаружено существенной разницы в уровне TNFα между пациентами с ПТГА и контрольной группой или между пациентами с ранней и поздней стадиями заболевания. Согласно данным литературы, TNFα не определялся или обнаруживался на низких уровнях в синовиальной жидкости у пациентов с посттравматическим ОА запястья, а также с первичным остеоартрозом коленного сустава [16]. Было показано, что синовиальная среда при повреждении передней крестообразной связки является в основном анаболической и воспалительной, с повышенными уровнями IL-1β и IL-6 и значительно сниженными уровнями TNFα [18].

Анализ ROC-кривых показал, что комбинация IL-6 и лептина в плазме дает лучшие параметры AUC (Area Under Curve, площадь под ROC-кривой), отличающие группу ПТГА от контроля (рис. 1). Обнаружена положительная корреляция между уровнями лептина в СЖ и плазме, а также корреляция между этими параметрами и тяжестью ПТГА согласно рентгенологическому методу, что согласуется с исследованием [19]. Кроме того, лептин можно считать маркером поздней стадии заболевания (табл. 2). Интересно, что, подобно IL-6, лептин, высвобождаемый жировой тканью, стимулирует проницаемость сосудов и стимулирует ангиогенез через факторы роста FGF-2 и VEGF [20]. Известно, что ангиогенез и воспаление являются взаимосвязанными процессами при ОА, которые могут влиять на прогрессирование заболевания и болевой синдром [19].

Синовиальный уровень ИЛ-18 достоверно коррелировал с тяжестью ПТГА, а концентрация мочевой кислоты в плазме была повышена у пациентов с ПТГА. В исследовании [21] продемонстрировано, что концентрация мочевой кислоты в СЖ коррелировала с синовиальными уровнями цитокинов IL-1β и IL-18, которые, как известно, продуцируются инфламасомами, активированными мочевой кислотой. Фактически была показана связь синовиального IL-18 с прогрессированием ОА, что согласуется с нашими результатами. Интересно, что лептин усиливает секрецию IL-18 человеческими моноцитами путем модуляции функции инфламасомы и активации каспазы-1 [22]. Однако в данном исследовании не наблюдалось корреляции IL-18 с уровнями лептина в плазме или СЖ (*p* > 0,05).

Ранее было показано, что лептин индуцирует выработку NO• посредством активации фосфорилирования eNOS [23] и усиления индуцирующего действия IL-1β на iNOS [24]. Наши результаты продемонстрировали повышение уровня NO_x- в плазме крови и СЖ при ПТГА, особенно у пациентов с ранней стадией заболевания (табл. 2). Известно, что при ОА хондроциты наряду с провоспалительными медиаторами генерируют оксид азота (NO•), сверхпродукция которого осуществляется, главным образом, индуцибельной NO-синтазой. В результате ROC-анализа была показана прогностическая ценность определения уровня NO_x- в плазме крови как предиктора ранней стадии ПТГА. Чувствительность теста равна 84,4%, специфичность - 100%, значения площади под ROC-кривой (area under curve, AUC) – 0,888 (0,826–0,949) при *p* < 0,00001. Следовательно, концентрацию NO_x- можно считать маркером ранней стадии ПТГА.

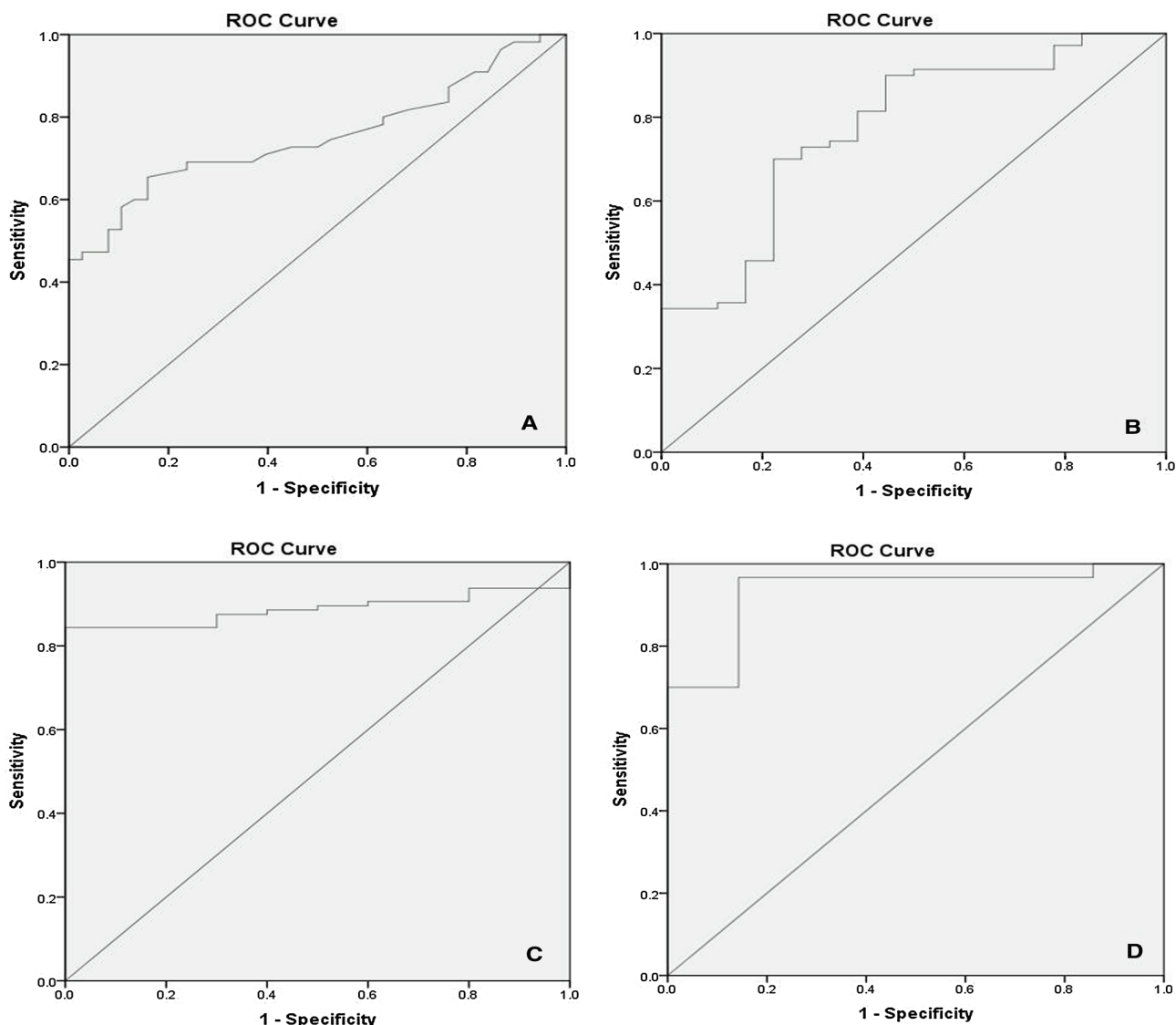


Рисунок 1. ROC-кривые биомаркеров ПТГА в плазме крови. А – уровень IL-6; В - уровень мочевой кислоты; С – уровень NOx-; D – уровни IL-6 и лептина

Высокие локальные концентрации NO• негативно влияют на функции хондроцитов, ингибируя синтез компонентов матрикса – коллагена и протеогликанов, активируя металлопротеиназы, уменьшая экспрессию антагониста рецептора IL-1 β , ингибируя пролиферацию хондроцитов [5].

Провоспалительные цитокины играют важную роль в образовании активных форм кислорода и азота (АФКА), которые вносят существенный вклад в прогрессирование артроза [25, 26]. Нитрозильный стресс, развивающийся в плазме крови и синовиальной жидкости пациентов с ПТГА, может быть обусловлен активацией индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая экспрессируется в хрящевой ткани и продуцирует большие количества NO• под действием провоспалительных цитокинов [27]. Следует отметить, что iNOS, преимущественно, регулируется на уровне транскрипции, при этом промотор гена iNOS содержит сайты связывания многих транскрипционных факторов: AP-1, CREB, HIF, NF-kB и др., в том числе, индуцируемых IL-1 β и TNF α [28].

Таким образом, у пациентов с ранними и поздними стадиями посттравматического артроза коленного сустава повышен уровень циркулирующих провоспалительных медиаторов: нитритов/нитратов (NOx-), IL-6 и мочевой кислоты по сравнению со здоровыми лицами. Циркулирующие уровни NOx-, IL-1 β , IL-6, мочевой кислоты, лептина и комбинации IL-6 и лептина могут быть потенциальными диагностическими тестами в соответствии с результатами ROC-анализа. Уровни NOx-, IL-6, IL-18 и лептина в плазме достоверно коррелировали с их содержанием в СЖ. Тяжесть ПТГА коррелировала с уровнем лептина в плазме и СЖ, а также с уровнем синовиального IL-18. Мультиномиальная логистическая регрессия показала, что более высокий уровень IL-1 β в плазме был связан с ранней стадией ПТГА после поправки на возраст, пол и ИМТ.

Известно, что в хондроцитах человека под действием изоферментов синтазы оксида азота (NOS) синтезируется NO•, сверхпродукция которого показана при гонартрозе, что подтверждено использованием антител к нитротирозину [29]. NO• является ключевым индуктором апоптоза хондроцитов, приводящего к

дегенеративным изменениям тканей сустава. Содержание 3-нитротирозина, маркера нитрозильного стресса, коррелирует с уровнем апоптоза хондроцитов и степенью истощения протеогликанов при индуцированном артрозе. NO• при взаимодействии с супероксидом образует пероксинитрит и гидроксильные радикалы, повреждающие ткани и запускающие процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [26]. Апоптоз хондроцитов и продукция NO• отмечаются на самых ранних стадиях артроза. NO• синтезируется с участием трех изоформ NO-синтаз: нейрональной nNOS (NOS1), индуцибельной iNOS (NOS2) и эндотелиальной eNOS (NOS3), при этом доказано, что все три изоформы NOS экспрессируются и активируются в хондроцитах ростовой пластинки [5]. Известно, что нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы играют важную роль в пролиферации, созревании и апоптозе хондроцитов. У nNOS- и eNOS-нокаутных мышей наблюдались нарушения данных процессов и сниженное количество пролиферирующих хондроцитов [30, 31]. Анализ литературы показывает, что ассоциация полиморфных маркеров генов NO-синтаз с развитием артроза слабо изучена.

Исследование роли полиморфного локуса -84G>A гена NOS1 показало, что аллель -84A ассоциирован с ПТГА, поскольку его наличие увеличивает в 2,02 раза риск развития патологии. Точечная замена в позиции -84G>A экзона 1с промотора гена nNOS, вероятно, вносит вклад в уменьшение экспрессии гена nNOS: генотип -84AA и аллель -84 A связаны со сниженной на 30 % экспрессией nNOS, что может снижать эффективность важнейшего сигнального пути NO/cGMP/cGMP-зависимые киназы [32]. Известно, что этот путь ингибирует активность каспаз, в том числе, благодаря регуляции генов семейства Bcl-2 [33]. По-видимому, репрессия данного пути может привести к активации каспазного каскада и индукции апоптоза.

Для определения связи между уровнем нитрозильного стресса, связанного с избыточной продукцией активных форм азота (АФА), и генотипом пациентов с ПТГА использовался множественный регрессионный анализ. В качестве зависимой переменной было принято содержание нитритов/нитратов (NOx-) в плазме или СЖ, в качестве независимых переменных – пол, возраст, индекс массы тела, рентгенологическая стадия заболевания и генотип локусов -786T > C eNOS и -84G > A nNOS. В результате для зависимой переменной – NOx- в плазме крови — в уравнение регрессии (коэффициент множественной корреляции R = 0,556; p = 0,029) были включены два предиктора: $y = 3,7 - 0,026x_1 + 0,189x_2$, где x_1 — индекс массы тела пациента (p = 0,069), а x_2 — пол пациента (p = 0,18): женский пол – 0, мужской – 1. Из всех переменных в уравнение регрессии (R = 0,567; p = 0,014) для содержания NOx- в синовиальной жидкости были также включены два предиктора: $y = 2,5 - 0,199x_1 + 0,023x_2$, где x_1 – генотип локуса -786T > C eNOS (p = 0,049): TT — 0, TC — 1, CC — 2; x_2 — ИМТ (p = 0,08). Результаты данного математического моделирования свидетельствуют о том, что варианты -786T>C гена eNOS статистически достоверно связаны с концентрацией нитритов/нитратов в СЖ при посттравматическом гонартрозе.

Сравнив уровни NOx- в СЖ трех групп пациентов, имеющих различные генотипы (-786 TT, TC, CC), обнаружена тенденция к различию этих трех групп (H = 5,9, p = 0,0523): при генотипе TT содержание NOx- составило 23,13 (21,78–26,64) мМ/л, при генотипе TC — 22,38 (13,82–23,68) мМ/л, при генотипе CC — 11,22 (11,09–16,70) мМ/л. Эти результаты согласуются с данными литературы о снижении активности промотора гена у здоровых лиц-носителей мутантного аллеля C [34]. Протеомный и экспрессионный анализ культуры эндотелиальных клеток человека с генотипом двух видов — TT и CC — показывает, что клетки с генотипом CC обладают сниженной экспрессией eNOS и сниженной способностью к синтезу NO•, по сравнению с клетками, имеющими генотип TT [35].

В настоящей работе нами не было выявлено ассоциации полиморфизма T-786C eNOS с риском развития ПТГА, однако в сочетании с генотипом локуса G-84A nNOS он может участвовать в определении степени риска развития данной патологии.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о развитии нитрозильного стресса в плазме крови и синовиальной жидкости при посттравматическом гонартрозе, при этом содержание нитритов/нитратов в СЖ было связано с генотипом локуса -786T>C гена eNOS: носительство мутантного аллеля -786 C приводит к снижению содержания NOx-. Аллель -84A гена nNOS ассоциирован с риском развития посттравматического ГА и повышением интенсивности апоптоза хондроцитов. Это подтверждается проведенным ранее электронно-микроскопическим исследованием хрящевой ткани пациентов с ПТГА, содержащей хондроциты, находящиеся на ранних и поздних стадиях программируемой клеточной гибели [8].

Таким образом, установлено, что циркулирующие уровни NOx-, лептина, IL-6, мочевой кислоты, и комбинации IL-6 и лептина могут быть информативными диагностическими биомаркерами развития ПТГА в соответствии с результатами ROC-анализа, а определение полиморфного маркера гена NOS1 (аллель -84A) ассоциированного с развитием ПТГА, повысит точность и информативность диагностики генетической предрасположенности к развитию посттравматического гонартроза.

Список литературы / References:

1. Loeser R.F., Steven R.G., Carla R.S., Goldring M.B. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum.*, 2012, vol. 64, no. 6. DOI: 10.1002/art.34453.
2. Saito T., Tanaka S. Molecular mechanisms underlying osteoarthritis development: Notch and NF-κB. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, vol. 19, no. 94. DOI: 10.1186/s13075-017-1296-y.
3. Каратеев А.Е., Лила А.М. Остеоартрит: современная клиническая концепция и некоторые перспективные терапевтические подходы. *Научно-практич. ревматол.*, 2018, т. 56, № 1. DOI: org/10.14412/1995-4484-2018-70-

81. [Karateev A.E., Lila A.M. Osteoartrit: sovremennaya klinicheskaya koncepciya i nekotorye perspektivnye terapevicheskie podhody. *Nauchno-praktich. revmatol*, 2018, vol. 56, no. 1. DOI: org/10.14412/1995-4484-2018-70-81. (In Russ.)]
4. Vnukov V.V., Panina S.B., Krolevets I.V., Milutina N.P., Ananyan A.A., Zabrodin M.A., Plotnikov A.A. Specificities of Oxidative Stress in the Blood and Synovial Fluid in Knee Osteoarthritis. *Advances in Gerontology*, 2015, vol. 5, no. 4. DOI: 10.1134/S2079057015040220.
5. Abramson S.B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, vol. 10, no. S2. DOI: 10.1186/ar2463.
6. Mabey T., Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2015, vol. 6, no. 1. DOI: 10.5312/wjo.v6.i1.95.
7. Olson S.A., Horne P., Furman B., Huebner J., Al-Rashid M., Kraus V.B., Guilak F. The role of cytokines in posttraumatic arthritis. *Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2014, vol. 22, no. 1. DOI: 10.5435/JAAOS-22-01-29.
8. Vnukov V.V., Krolevets I.V., Panina S.B., Milyutina N.P., Ananyan A.A., Plotnikov A.A., Zabrodin M.A. The Association Between NO-Synthase Gene Polymorphisms and the Development of Post-Traumatic Knee Osteoarthritis Among Residents of Rostov Region. *Russian J. Genetics: Applied Research*, 2017, vol. 7, no. 2. DOI: 10.1134/S2079059717020150.
9. Anderson D.D., Chubinskaya S., Guilak F., Martin J.A., Oegema T.R., Olson S.A., Buckwalter J.A. Post-Traumatic Osteoarthritis: Improved Understanding and Opportunities for Early Intervention. *J. Orthop. Res.*, 2011, vol. 29, no 6. DOI: 10.1002/jor.21359.
10. Valdes A.M., Spector T.D. The contribution of genes to osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, 2008, vol. 34, no. 3, doi.org/10.1016/j.rdc.2008.04.008.
11. Valdes A.M., Doherty S.A., Muir K.R., Wheeler M., Maciewicz R.A., Zhang W., Doherty M. The genetic contribution to severe post-traumatic osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, vol. 72, no. 10. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202562.
12. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NOx-) в сыворотке крови. *Биомед. химия*, 2004, т. 50, № 1. [Golikov P.P., Nikolaeva N.Yu. Metod opredeleniya nitrita/nitrata (NOx-) v syvorotke krovi. *Biomed. himiya*, 2004, vol. 50, no. 1. (In Russ.)]
13. Simundic A.-M. Diagnostic Accuracy. Part 1: Basic Concepts: Sensitivity and Specificity, ROC Analysis, STARD Statement. *Point of Care*, 2012, vol. 11, no 1.
14. Furman B.D., Mangiapani D.S., Zeitler E., Bailey K.N., Horne P.H., Huebner J.L., Kraus V.B., Guilak F., Olson S.A. Targeting pro-inflammatory cytokines following joint injury: acute intra-articular inhibition of interleukin-1 following knee injury prevents post-traumatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2014, vol. 16, no. 3. DOI: 10.1186/ar4591.
15. Bigoni M., Sacerdote P., Turati M., Franchi S., Gandolla M., Gaddi D., Moretti S., Munegato D., Augusti C.A., Bresciani E., Omeljaniuk R.J., Locatelli V., Torsello A. Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury. *J. Orthop. Res.*, 2013, vol. 31, no. 2. DOI: 10.1002/jor.22208.
16. Teunis T., Beekhuizen M., van Osch G.V.M., Schuurman A.H., Creemers L.B., van Minnen L.P. Soluble mediators in posttraumatic wrist and primary knee osteoarthritis. *Arch. Bone. Jt. Surg.*, 2014, vol. 2, no. 3. DOI: abjs.mums.ac.ir.
17. Ning L., Ishijima M., Kaneko H., Kurihara H., Arikawa-Hirasawa E., Kubota M., Liu L., Xu Z., Futami I., Yusup A., Miyahara K., Xu S., Kaneko K., Kurosawa H. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. *Int. Orthop.*, 2011, vol. 35, no. 6. DOI: 10.1007/s00264-010-1045-1.
18. de Albornoz P.M., Forriol F. Changes in synovial fluid in different knee-joint diseases. *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.*, 2012, vol. 56, no. 2. DOI: 10.1016/j.recote.2012.03.003.
19. Ku J.H., Lee C.K., Joo B.S., An B.M., Choi S.H., Wang T.H., Cho H.L. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin. Rheumatol.*, 2009, vol. 28, no. 8. DOI: org/10.1007/s10067-009-1242-8.
20. Cao R., Brakenhielm E., Wahlestedt C., Thyberg J., Cao Y. (2001) Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, no. 11. DOI: 10.1073/pnas.101564798.
21. Denoble A.E., Huffman K.M., Stabler T.V., Kelly S.J., Hershfield M.S., McDaniel G.E., Coleman R.E., Kraus V.B. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 5. DOI: 10.1073/pnas.1012743108.
22. Jitprasertwong P., Jaedicke K.M., Nile C.J., Preshaw P.M., Taylor J.J. Leptin enhances the secretion of interleukin (IL)-18, but not IL-1 β , from human monocytes via activation of caspase-1. *Cytokine*, 2014, vol. 65, no. 2. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.10.008.
23. Vecchione C., Maffei A., Colella S., Aretini A., Poulet R., Frati G., Gentile M.T., Fratta L., Trimarco V., Trimarco B., Lembo G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*, 2002, vol. 51, no. 1. DOI: 10.2337/diabetes.51.1.168.
24. Joffin N., Niang F., Forest C., Jaubert A.-M. Is there NO help for leptin? *Biochimie*, 2012, vol. 94, no. 10. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.06.017.

25. Abramson S.B. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, vol. 16, no. S2. DOI: 10.1016/S1063-4584(08)60008-4.
26. Feelisch M. The chemical biology of nitric oxide — an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, vol. 16, no. 2. DOI: 10.1016/S1063-4584(08)60007-2.
27. Castro R.R., Cunha F.Q., Silva F.S.Jr., Rocha F.A. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis-evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, vol. 14, no. 8. DOI: 10.1016/j.joca.2006.01.013.
28. Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 2010, vol. 23, no. 2. DOI: 10.1016/j.niox.2010.04.007.
29. Loeser R.F., Carlson C.S., Del Carlo M., Cole A. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1 β and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum.*, 2002, vol. 46, no. 9. DOI: 10.1002/art.10496.
30. Yan Q., Feng Q., Beier F. Endothelial nitric oxide synthase deficiency in mice results in reduced chondrocyte proliferation and endochondral bone growth. *Arthritis Rheum.*, 2010, vol. 62, no. 7. DOI: 10.1002/art.27486.
31. Yan Q., Feng Q., Beier F. Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, vol. 20, no. 2. DOI: 10.1016/j.joca.2011.11.014.
32. Miao X., Garcia-Barcelo M.M., So M., Tang W., Dong X., Wang B., Mao J., Ngan E.S., Chen Y., Lui V.C., Wong K.K., Liu L., Tam P.K. Lack of association between nNOS -84G > A polymorphism and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis in a Chinese population. *J. Pediatr. Surg.*, 2010, vol. 45, no. 4. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.07.067.
33. Olson S.Y., Garban H.J. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide*, 2008, vol. 19, no. 2. DOI: 10.1016/j.niox.2008.04.005.
34. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M., Shimasaki Y., Kugiyama K., Ogawa H., Motoyama T., Saito Y., Ogawa Y., Miyamoto Y., Nakao K. T-786 C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 1999, vol. 99, no. 22. DOI: 10.1161/01.cir.99.22.2864.
35. Asif A.R., Oellerich M., Armstrong V.W., Hecker M., Cattaruzza M. T-786C polymorphism of the nos-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress – a proteome analyses. *J. Proteome. Res.*, 2009, vol. 8, no. 6. DOI: 10.1021/pr800998k.

ROLE OF THE NITROGEN OXIDE SYSTEM AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE PATHOGENETIC MECHANISMS OF DEGENERATIVE JOINT DISEASES

Vnukov V.V.¹, Krolevets I.V.², Plotnikov A.A.¹, Ananyan A.A.¹, Kolesnikov M.A.³, Milyutina N.P.¹

¹Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology,
Stachky av., 194/1, Rostov-on-Don, 344090, Russia; e-mail: natmilut@rambler.ru

²Rostov State Medical University
Nahichevansky lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

³City Clinical Hospital No.2
st. Balakireva, 5, Stavropol, 355018, Russia

Abstract. It was investigated the levels of nitric oxide, pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α), leptin and uric acid in blood plasma and synovial fluid (SF) as biomarkers of post-traumatic gonarthrosis (PTGA), as well as their association with radiological stage of PTGA. It was found that in patients with early and late stages of post-traumatic arthrosis of the knee joint, the level of circulating pro-inflammatory mediators: nitrites / nitrates (NOx), IL-6, and uric acid was increased compared with healthy individuals. Circulating levels of NOx, IL-1, IL-6, uric acid, leptin, and a combination of IL-6 and leptin can be potential diagnostic tests according to the ROC curve analysis. Plasma levels of NOx, IL-6, IL-18, and leptin significantly correlated with their levels in the SF. The severity of PTGA correlated with the level of leptin in plasma and SF, as well as with the level of synovial IL-18. The association of polymorphic variants of the nNOS and eNOS genes with the risk of developing post-traumatic gonarthrosis (PTGA) in residents of the Rostov region was studied. It has been established that the -84A allele of the nNOS polymorphic gene is associated with the risk of developing PTGA.

Key words: post-traumatic gonarthrosis, blood plasma, synovial fluid, nitric oxide, pro-inflammatory cytokines, leptin, NO synthase genes.

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСПОРТНЫХ И ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В КЛЕТКАХ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Тамашевский А.В.¹, Гармаза Ю.М.¹, Пасюков В.В.², Слобожанина Е.И.¹

¹ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

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

² Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ
Долгиновский тракт, 160, г. Минск, 220053, Республика Беларусь

Поступила в редакцию: 27.07.20

Аннотация. Проведена оценка содержания транспортных белков, ассоциированных с феноменом множественной лекарственной устойчивости (Р-гликопротеина и белка множественной лекарственной резистентности MRP1) и уровня экспрессии цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов в лимфоцитах условно здоровых доноров, В-лимфобластоидной клеточной линии IM9 и ее сублинии, резистентной к флударабелу. Обнаружено снижение соотношения экспрессии Р-гликопротеина к MRP1 в В-лимфобластоидной клеточной сублинии IM9, резистентной к флударабелу, относительно ее родительской линии IM9. Установлено, что одним из механизмов, вносящих вклад в развитие множественной лекарственной устойчивости в клеточной линии IM9 наряду с возрастанием роли белка MRP1 также выступает активация цистеин-обогащенных цитозольных белков металлотионеинов I/II классов.

Ключевые слова: клеточная линия IM9, белки множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеин и MRP1, металлотионеины, противоопухолевые препараты.

Известно, что основным методом лечения онкогематологических заболеваний является интенсивная химиотерапия. Однако, несмотря на высокий процент ремиссий, количество пациентов с долгосрочным прогнозом оказывается не таким значительным. Кроме того, что химиотерапия является причиной тяжёлых побочных эффектов, особенно у пожилых людей, часто её неэффективность может обуславливаться феноменом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – невосприимчивости клеток опухоли одновременно к целому ряду лекарственных средств с широким спектром механизмов воздействия на внутриклеточные мишени.

Феномен МЛУ связывают с функционированием АТФ-зависимых транспортеров суперсемейства ABC, которые снижают внутриклеточную концентрацию лекарственных соединений путем их выброса из клеток с использованием энергии гидролиза АТФ [1]. К настоящему времени у человека выявлено 49 представителей ABC суперсемейства с различными физиологическими функциями и лишь три из них (Р-гликопротеин (Р-gr), белок множественной лекарственной резистентности 1 (MRP1) и белок, ответственный за резистентность клеток рака молочной железы (BCRP)) непосредственно связаны с фенотипом МЛУ [2].

Конститутивная экспрессия транспортеров МЛУ отмечена во многих органах и тканях организма человека [3], в том числе и в лимфоцитах периферической крови [4] (за исключением BCRP [5]), однако, их физиологическая функция до сих пор точно не определена [6]. Тем не менее, значимость роли ABC транспортеров в поддержании клеточного гомеостаза подчеркивает тот факт, что почти треть дефектных ABC генов человека связана с заболеваниями [7]. В последнее время появились экспериментальные данные о тесной взаимосвязи между прогрессированием опухолей и клеточным редокс-балансом [8, 9]. Ранее нами было также показано, что изменение окислительно-восстановительного баланса играет ключевую роль в ответной реакции клетки на воздействие противоопухолевых агентов и является важным регулятором экспрессии белков-транспортеров, ассоциированных с МЛУ [10, 11]. Одним из ключевых цитозольных белков, регулирующих содержание эссенциальных и неэссенциальных микроэлементов и способных инактивировать активные формы кислорода (АФК) и азота, являются низкомолекулярные клеточные тиолы металлотионеины (MTs). Установлено, что их повышенное содержание в клетках связано с развитием опухолей, т.к. они способны защищать их от процессов программируемой гибели [12].

Таким образом, целью данной работы явилось сравнительное исследование содержания металлотионеинов и уровня экспрессии белков-транспортеров, ассоциированных с МЛУ (MRP1 и Р-gr) в лимфоцитах доноров, а также в клеточной линии IM9 и ее сублинии, резистентной к флударабелу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров (n=6), полученная из ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий" МЗ РБ. Все образцы крови содержались в консерванте "гепарин".

Периферические мононуклеарные клетки крови человека (ПМНК) изолировали в градиенте плотности гистобака-1077 путем центрифугирования крови (300×g, 30 мин) и последовательных отмывок в 10 мМ фосфатном буфере (PBS, pH 7,4). После выделения ПМНК помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамина. Клеточные линии и ПМНК

инкубировали в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO_2 при температуре 37°C в течение 48 ч с флударабелом – белорусский аналог флударабина (Flu; 17,5 мкМ), лейкладином – белорусский аналог кладрибина (Leu; 7 мкМ) и винкристином (Vinc; 47,2 нМ).

В-лимфобластоидную клеточную линию IM9 и ее резистентную сублинию IM9-Flu, устойчивую к флударабелу, культивировали в коммерческой среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамина при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO_2 в течение 1–2 недель. В дальнейших экспериментах были использованы клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста.

Степень экспрессии P-gp на поверхности плазматической мембраны ПМНК и клеточных линий оценивали с помощью моноклональных антител (MkAT, клон UIC2, Abcam), неспецифическое связывание контролировали с помощью IgG2a. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FITC-Н канале и по отношению интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с UIC2 (I_{фл. о}), к интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с изотипическим контролем IgG2a (I_{фл. к}), судили о количестве P-gp на поверхности исследуемых клеток.

Количество MRP1 в ПМНК и клеточных линиях определяли с помощью MkAT (клон QCRL, R&D) против данного белка. В качестве изотипического контроля использовали мышиные MkAT IgG1. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II в FITC-Н канале и по отношению интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с QCRL (I_{фл. о}), к интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с изотипическим контролем IgG1 (I_{фл. к}), судили о количестве MRP1 в исследуемых клетках.

Для оценки содержания металлотионеинов I и II типов ПМНК и клеточные линии фиксировали 2%-м раствором параформальдегида (60 мин, $t=4\pm 2^\circ\text{C}$), отмывали путем центрифугирования (300g, 15 мин) и проводили пермеабиллизацию мембран 0,5%-м раствором детергента твин 20 в PBS буфере (10 мин, $t=4\pm 2^\circ\text{C}$). Далее проводили последовательную инкубацию клеток с первичными мышиными MkAT против металлотионеинов UC1MT (12 ч, $t=4\pm 2^\circ\text{C}$) и с вторичными поликлональными козлиными антителами, конъюгированными с FITC, против мышиного IgG1 (2 ч, $t=4\pm 2^\circ\text{C}$). В качестве изотипического контроля использовали мышиные MkAT, конъюгированные с FITC, против IgG1, которые параллельно инкубировали с исследуемыми клетками при вышеописанных условиях. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II в FITC-Н канале и по отношению интенсивности флуоресценции образцов с комплексом “UC1MT–IgG1-FITC” (I_{фл. о}) к интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с изотипическим контролем IgG1-FITC (I_{фл. к}), судили о содержании MTs в исследуемых клетках.

О жизнеспособности ПМНК и клеточных линий после воздействия лекарственных средств, в концентрациях близких к терапевтическим, судили по степени метаболической (дегидрогеназной) активности их митохондрий с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (MTT) теста. Результирующие данные для этого метода представлены в виде отношения среднего значения оптической плотности образца с исследуемым химиопрепаратом (D) к среднему значению оптической плотности образца без него (D_к), выраженного в процентах. Измерение оптической плотности образцов проводили на планшетном спектрофотометре ELISA (Sanofi Diagnostic Pastuer PR 2100) при $\lambda=540$ нм.

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

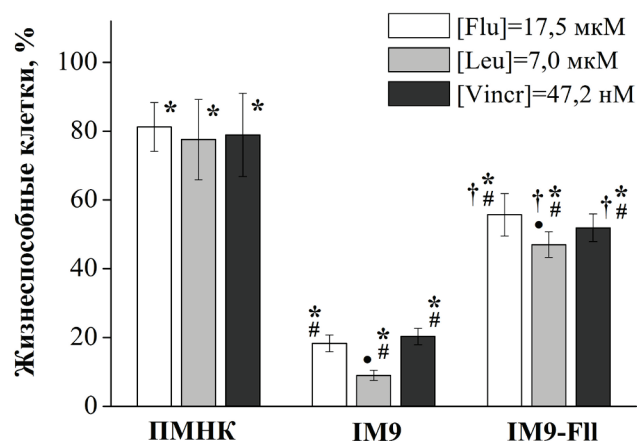
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что множественная миелома человека – это злокачественное новообразование из плазматических клеток или дифференцированных В-лимфоцитов, продуцирующих моноклональные иммуноглобулины или их фрагменты. Данное заболевание системы крови относится к парапротеинемическим лейкозам и считается неизлечимым [13]. Для исследования этого заболевания *in vitro* часто используют В-лимфобластоидную клеточную линию IM-9, полученную от пациентки с множественной миеломой. В качестве противоопухолевого средства, способного вызвать лекарственную устойчивость клеточной линии IM9, использовали антимаболит из класса нуклеозидных аналогов – флударабин. Он демонстрирует хорошие результаты при терапии острых лимфобластных лейкозов и неходжкинских лимфом, а также применяется в протоколах лечения В-хронического лимфоцитарного лейкоза [14]. При попадании в клетку химиопрепарат фосфорилируется нуклеозидными киназами последовательно в моно-, ди- и трифосфаты флударабина [15], последние из которых встраиваются в ДНК и иницируют в ней одноцепочечные разрывы, а также способны ингибировать ДНК полимеразу [16]. Кроме этого, 5'-трифосфат флударабина снижает уровень ДНК метилирования [14]. Совместно эти процессы блокируют синтез и репарацию ДНК и иницируют гибель патологических клеток.

Для выяснения вопроса о степени резистентности сублинии IM9-Flu к исследуемым лекарственным средствам, в концентрациях близких к терапевтическим, была проведена оценка уровня метаболической активности (жизнеспособности) данных клеток с помощью МТТ-теста.

На рисунке 1 представлены результаты по содержанию жизнеспособных клеток после воздействия флударабела, лейкладина и винкристина на ПМНК и клеточные линии (IM9 и IM9-Flu) в течение 48 ч.

Как видно из рисунка, жизнеспособность ПМНК и клеточных линий после воздействия всех исследуемых лекарственных средств статистически достоверно снижалась по сравнению с интактными клетками (контроль).



Количество интактных клеток в культуральной среде без лекарственных средств принято за 100% (контроль);

* – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$);

– различия достоверны по сравнению с PMNK ($p < 0,05$);

† – различия достоверны по сравнению с клетками IM9 ($p < 0,05$);

● – различия достоверны по сравнению с FII и Vincr ($p < 0,05$)

Рисунок 1. Процентное содержание жизнеспособных PMNK, IM9 и IM9-FII клеток после воздействия флударабела, лейкладина и винкристина в течение 48 ч *in vitro*

Причем, для PMNK она находилась практически на одном уровне после воздействия FII, Leu и Vincr и составила в среднем соответственно 81%, 78% и 79% (рисунок 1). Стоит отметить, что снижение жизнеспособности PMNK в среднем на 20% после воздействия FII, Leu и Vincr может указывать на их неспецифичность в отношении лимфоцитов условно здоровых доноров. Снижение жизнеспособности клеточной линии IM9 составило в среднем 80% (после воздействия FII и Vincr) и 90% (после экспозиции клеток с Leu) по сравнению с контролем, причем этот результат также статистически достоверен по сравнению с PMNK и IM9-FII клетками, что свидетельствует об эффективности данных химиопрепаратов в отношении клеток IM9 (рис. 1). Воздействие FII, Leu и Vincr на сублинию IM9-FII приводило к снижению жизнеспособности клеток в среднем на 45-55%, причем полученный результат также статистически достоверен по сравнению с PMNK и IM9 клетками. Более того, резистентность сублинии IM9-FII к Vincr, FII и Leu была в среднем в 2,6–5,2 раза выше по сравнению с родительской линией IM9, причем максимальную устойчивость IM9-FII клетки проявили к Leu, а минимальную – к Vincr (рисунок 1). Данный факт указывает на развитие перекрестной резистентности к Leu и Vincr у клеточной линии IM9-FII.

Стоит отметить, что жизнеспособность клеточных линий IM9 и IM9-FII после воздействия Leu была статистически достоверно снижена по сравнению с таковой после воздействия FII и Vincr (рис. 1). Возможно, подобная избирательность Leu связана со специфическими внутриклеточными мишенями в данном типе клеток, хотя его отличие от FII заключается в наличии атома хлора во втором положении пуринового гетероцикла вместо атома фтора, а при попадании в клетку он фосфорилируется таким же образом, как и FII, т.к. относится также к классу аналогов пуриновых нуклеозидов [15, 16]. С другой стороны, статистическая достоверность между воздействием Vincr и FII на клеточные линии IM9 и IM9-FII отсутствует, хотя Vincr относится к совершенно другому типу лекарственных средств (классу винка-алкалоидов) и в основном его цитотоксический эффект проявляется в ингибировании полимеризации микротрубочек (путем связывания с тубулином), митотического веретена деления и нарушении внутриклеточного транспорта [17]. Таким образом, клеточная сублиния IM9-FII, устойчивая к FII, приобрела перекрестную резистентность не только к лекарственным средствам из класса аналогов пуриновых нуклеозидов (Leu), но также и к соединениям из класса винка-алкалоидов (Vincr), что позволяет говорить о формировании МЛУ.

Как было сказано выше, два транспортера семейства ABC – P-gp и MRP1 ответственны за экспорт многих терапевтических агентов из лимфоцитов человека. К таким агентам также относятся и многие противоопухолевые препараты. Поэтому при проведении терапии очень важной является оценка экспрессии данных транспортеров, результаты которой могут повлиять на исход клинической картины. На сегодняшний день считается, что методы оценки “одной клетки” с помощью метода проточной цитофлуориметрии являются наиболее достоверными по сравнению с молекулярно-генетическими подходами [4]. Методом проточной цитофлуориметрии нами была проведена сравнительная оценка экспрессии белков-транспортеров P-gp и MRP1 в лимфоцитах условно здоровых доноров, клеточной линии IM9 и ее сублинии IM9-FII, резистентной к FII. На рисунке 2 представлены репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции MкАТ UIC2-FITC в лимфоцитах человека и клеточных линиях IM9/IM9-FII. Обнаружено, что содержание P-gp на поверхности плазматических мембран лимфоцитов доноров составляет в среднем $1,74 \pm 0,45$, в клетках В-лимфобластной линии IM9 – $2,55 \pm 0,45$, в то время как в флударабел-резистентной сублинии IM9-FII экспрессия P-gp снижалась и достигала в среднем значения $1,5 \pm 0,34$.

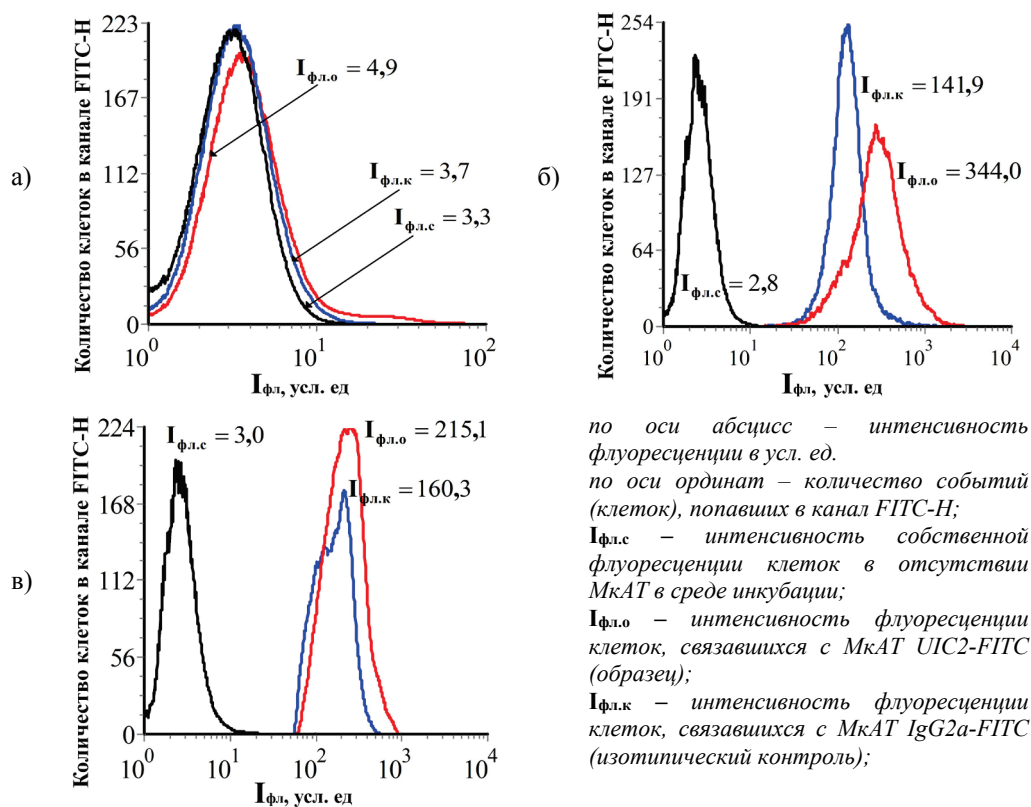


Рисунок 2. Репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции МкАТ UIC2-FITC и IgG2a-FITC в суммарной популяции лимфоцитов доноров (а), в лимфобластоидной клеточной линии IM9 (б) и в устойчивой к флударабелу сублинии IM9-FII (в)

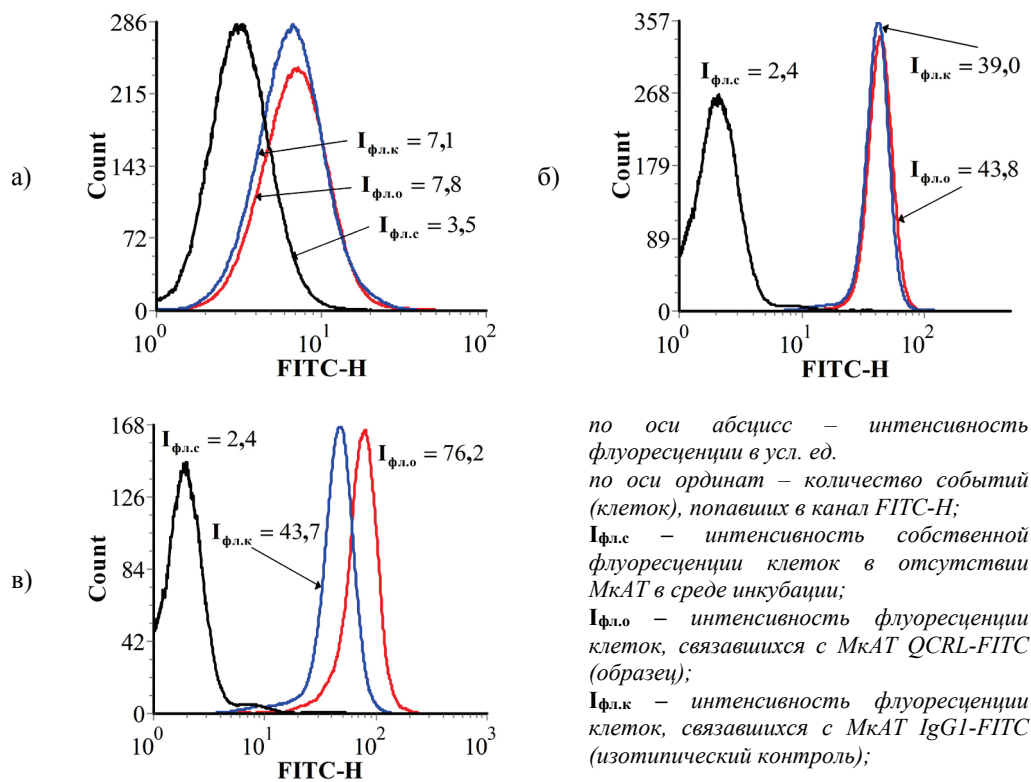


Рисунок 3. Репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции МкАТ QCRL-FITC и IgG1-FITC в суммарной популяции лимфоцитов доноров (а), в лимфобластоидной клеточной линии IM9 (б) и в устойчивой к флударабелу сублинии IM9-FII (в)

Параллельно была проведена оценка экспрессии другого белка-транспортера – MRP1 в исследуемых клеточных популяциях (рис. 3), которая выявила, что в интактных лимфоцитах доноров отношение интенсивности флуоресценции комплекса “MRP1–QCRL-FITC” к интенсивности флуоресценции комплекса “MRP1–IgG2a-FITC” (изотипический контроль) составляет в среднем $1,33 \pm 0,31$, в клеточной линии IM9 данный показатель составил в среднем $1,45 \pm 0,33$, а в ее флударабел резистентной сублинии IM9-FII – $2,1 \pm 0,44$.

Полученные нами результаты демонстрируют, что в суммарной популяции лимфоцитов человека экспрессируются оба исследованных белка-транспортера, ассоциированные с феноменом МЛЮ. Степень их экспрессии хорошо согласуется с ранее установленными величинами [4]. Также было выявлено, что в мембране клеток В-лимфобластоидной клеточной линии IM9 находится как MRP1, так и P-gr. Однако, если содержание MRP1 белка, как в интактных лимфоцитах доноров, так и в В-клетках линии IM9 сопоставима, то уровень экспрессии P-gr в клеточной линии IM9 в среднем на 40–50% выше, чем был определен для суммарной популяции лимфоцитов человека. Если провести сравнительный анализ содержания MRP1 и P-gr в родительской В-лимфобластоидной клеточной линии IM9 и ее сублинии, устойчивой к FII, то можно заключить, что при формировании феномена МЛЮ в В-лимфобластоидных клетках на фоне снижения содержания P-gr усиливается экспрессия другого белка-транспортера – MRP1. Объяснением этого результата может являться тот факт, что после фосфорилирования в клетке аналогов пуриновых нуклеозидов (в частности флуарабина/флуарабела и кладрибина/лейкладина) до их монофосфатной нуклеотидной формы, последующие процессы детоксикации могут затрагивать функционирование белков, ассоциированных с МЛЮ из семейства MRP [18], хотя напрямую их транспорт не ассоциирован с функционированием данных транспортеров, т.к. за вход в клетку нуклеотидных аналогов отвечают специализированные нуклеотидтранспортные системы [15, 19]. Более того, известно, что Vincr субстратно не специфичен по отношению к транспортерам, ассоциированным с МЛЮ, и способен затрагивать функционирование как P-gr, так и MRP1 [20, 21], что объясняет устойчивость к нему клеточной линии IM9-FII.

Таким образом, установлено, что в В-лимфобластоидной клеточной сублинии IM9, резистентной к FII, по сравнению с родительской линией IM9 наблюдается снижение содержания транспортера P-gr и увеличение – MRP1, т.е. происходит снижение соотношения основных транспортных белков, ассоциированных с феноменом МЛЮ (P-gr к MRP1).

Нами параллельно также была проведена оценка содержания цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов в исследуемых клеточных популяциях, уровень которых, как было установлено ранее [22, 23], непосредственно связан с оценкой и прогнозом течения заболевания и проведением химиотерапии.

На рисунке 4 представлены репрезентативные гистограммы распределения флуоресценции комплексов “UC1MT–IgG1-FITC” и “IgG1-FITC” (изотипический контроль к UC1MT) в суммарной популяции лимфоцитов доноров и клеточных линиях. Известно, что UC1MT представляют собой специфические мышиные МкАТ к двум

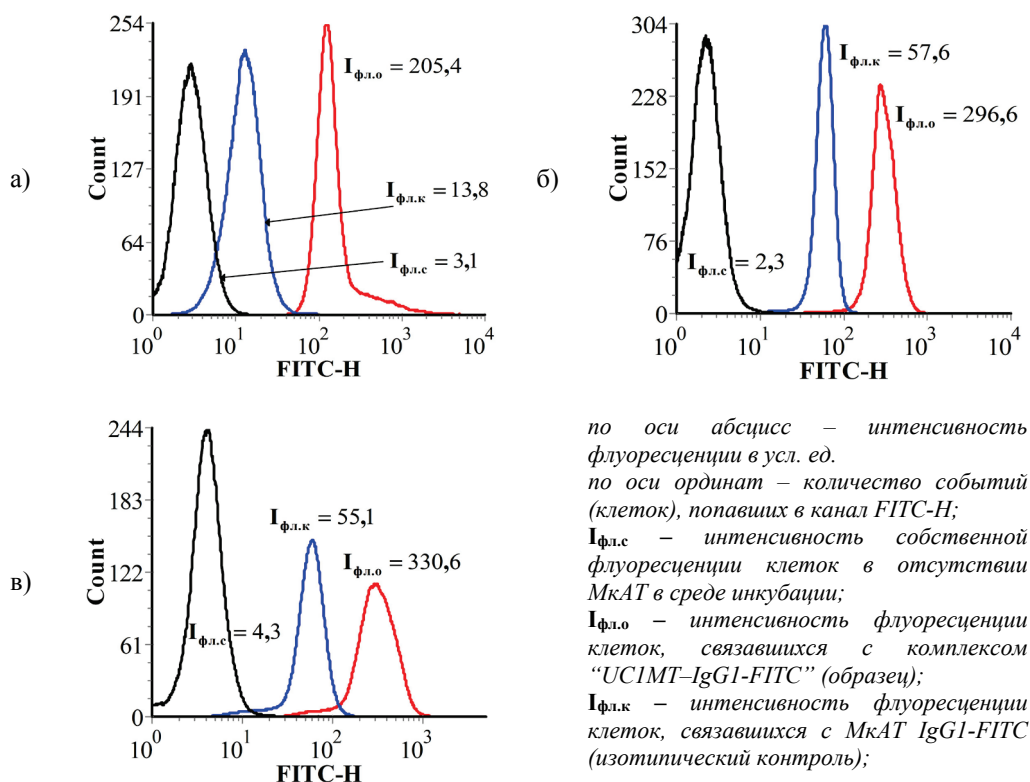


Рисунок 4. Репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции комплекса “UC1MT–IgG1-FITC” и МкАТ IgG1-FITC в суммарной популяции лимфоцитов доноров (а), в лимфобластоидной клеточной линии IM9 (б) и в устойчивой к флуарабелу сублинии IM9-FII (в)

классам MTs – MT I и MT II. По отношению интенсивности флуоресценции комплекса “UC1MT–IgG1-FITC” ($I_{фл.о}$) к интенсивности флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC ($I_{фл.к}$), характеризующему неспецифическое связывание антител, можно судить об относительном содержании MTs в исследуемых клетках.

Установлено, что для лимфоцитов доноров отношение интенсивности флуоресценции антител UC1MT–IgG1-FITC, связавшихся с клетками, к изотипическому контролю (IgG1-FITC) составило в среднем $15,3 \pm 3,9$, в то время как в В-клетках лимфобластоидной клеточной линии IM9 значение данного показателя составило $5,6 \pm 1,1$. Полученные результаты свидетельствуют, что в иммунных клетках человека содержание MTs в среднем в 2,7 раза выше, по сравнению с В-лимфобластоидной клеточной линией IM-9, в которой, очевидно, они в меньшей степени участвуют в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза. При проведении сравнительного анализа между содержанием MTs в клеточной линии IM9 и ее сублинии IM9-FII, было выявлено увеличение содержания данных низкомолекулярных белков в среднем на 15–25% в клетках сублинии, устойчивой к FII ($6,7 \pm 0,8$) по сравнению с родительской линией IM9 ($5,6 \pm 1,1$). Полученные результаты свидетельствуют, что в клеточной сублинии IM9-FII при формировании МЛУ происходит активация экспрессии металлотионеинов, которые способны принимать участие в процессах детоксикации клеток IM9-FII от метаболитов лекарственных средств.

Известно, что метаболизм Vincr в клетках происходит при участии монооксигеназной ферментативной системы (основное каталитическое звено – цитохром P-450), катализирующей протекание окислительных реакций с широким кругом субстратов [24]. В процессе циклического окисления ксенобиотиков на цитохроме P-450 могут образовываться АФК [25]. А одна из физиологических функций MRP1 в клетках состоит в регуляции гомеостаза “восстановленный – окисленный глутатион” [26], т.е. окислительно-восстановительного баланса, что также хорошо согласуется с увеличением содержания MTs в клеточной линии IM9-FII и их способностью инактивировать АФК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, одним из механизмов, вносящих вклад в развитие феномена множественной лекарственной устойчивости клеточной линии IM9-FII, наряду с усилением экспрессии транспортного белка MRP1, также выступает увеличение в них содержания низкомолекулярных цистеин-обогащенных цитозольных белков металлотионеинов I и II классов, способных инактивировать АФК, образующиеся при метаболизме лекарственных средств и участвовать в процессах детоксикации клеток.

Список литературы / References:

1. Ставровская А.А., Генс Г.П. Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. *Успехи молекулярной онкологии*, 2014, т. 1, № 1, с. 5-11 [Stavrovskaya A.A., Guens G.P. Multidrug resistance of tumor cells: some new trends in research. *Advances in Molecular Oncology*, 2014, vol. 1, no. 1, pp. 5-11. (In Russ.)]
2. Szakács G., Váradi A., Özvegy-Laczka C., Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today*, 2008, vol. 13, no. 9-10, pp. 379-393. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.12.010.
3. Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, vol. 204, pp. 216-237. DOI: 10.1016/j.taap.2004.10.012.
4. Meaden E.R., Hoggard P.G., Khoo S.H., Back D.J. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells *in vivo*. *Journal of Immunological Methods*, 2002, vol. 262, pp. 159-165. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00020-0.
5. Giraud C., Manceau S., Declèves X., Goffinet F., Morini J., Chappuy H., Batteux F., Chouzenoux S., Yousif S., Scherrmann J.-M., Blanche S., Tréluyer J.-M. Influence of development, HIV infection, and antiretroviral therapies on the gene expression profiles of ABC transporters in human lymphocytes. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2008, vol. 50, pp. 226-230. DOI: 10.1177/0091270009343696.
6. Fukuda Y., Schuetz J.D. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 2012, vol. 83, pp. 1073-1083. DOI: 10.1177/0091270009343696.
7. Dean M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods in Enzymology*, 2005, vol. 400, pp. 409-429. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)00024-8.
8. Wartenberg M., Hoffmann E., Schwindt H., Grünheck F., Petros J., Arnold J.R.S., Hescheler J., Sauer H. Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Letters*, 2005, vol. 579, pp. 4541-4549. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.06.078.
9. Ермакова Н.В. Исследование модификации множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.04; Рос. акад. наук, Ин-т теор. и эксперим. биофизики. М., 2005, 18 с. [Ermakova N.V. *Issledovanie modifikatsii mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti opuholevykh kletok*: avtoref. dis. kand. biol. nauk: 03.00.04; Ros. akad. nauk, In-t teor. i eksperim. biofiziki. M., 2005, 18 p. (In Russ.)]
10. Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И., Гончарова Н.В., Хлебко П.В., Свирновский А.И. Окислительный стресс в эритроцитах при хроническом лимфоцитарном лейкозе, индуцированный противоопухолевыми препаратами. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*, 2010, № 3, с. 62-66. [Tamashevski A.V.,

Slobozhanina E.I., Goncharova N.V., Khliabkho P.U., Svirnovski A.I. Oxidative stress in lymphocytes at chronic lymphocytic leukemia induced by anticancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological series*, 2010, no. 3, pp. 62-66. (In Russ.)]

11. Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Слобожанина Е.И., Свирновский А.И. Транспортная активность Р-гликопротеина при изменении редокс-баланса в лимфоцитах человека. *Новости медико-биологических наук*, 2012, т. 6, № 4, с. 173-182. [Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I. Transport activity P-glycoproteins under redox-balance change in human lymphocytes. *News of biomedical sciences*, 2012, vol. 6, no. 4, pp. 90-95. (In Russ.)]

12. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*, 2016, № 1, с. 107-116. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Mammalian methalothioneins: structure and biological role. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus*, 2016, no. 1, pp. 107-116. (In Russ.)]

13. Egan P., Drain S., Conway C., Bjourson A.J., Alexander H.D. Towards Stratified Medicine in Plasma Cell Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 10, pp. 1760-1781. DOI: 10.3390/ijms17101760.

14. Ricci F., Tedeschi A., Morra E., Montillo M. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2009, vol. 5, pp. 187-207. DOI: 10.2147/term.s3688.

15. Koczor C.A., Torres R.A., Lewis W. The role of transporters in the toxicity of nucleoside and nucleotide analogs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2012, vol. 8, no. 6, pp. 665-676. DOI: 10.1517/17425255.2012.680885.

16. Калиниченко Е. Модифицированные нуклеозиды: синтез и перспективы использования в качестве химиотерапевтических агентов. *Наука и инновации*, 2004, № 9, с. 57-64. [Kalinichenko E. Modified nucleosides: synthesis and prospects for use as chemotherapeutic agents. *Science and Innovations*, 2004, no. 9, pp. 57-64. (In Russ.)]

17. Jordan M.A., Himes R.H., Wilson L. Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell in proliferation vitro. *Cancer Res.*, 1985, vol. 45, pp. 2741-2747.

18. Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, no. 9, pp. 1048-1051. DOI: 10.1038/12487.

19. Damaraju V.L., Damaraju S., Young J.D., Baldwin S.A., Mackey J., Sawyer M.B., Cass C.E. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. *Oncogene*, 2003, vol. 22, pp. 7524-7536. DOI: 10.1038/sj.onc.1206952.

20. Szakács G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Rev. Drug Discov.*, 2006, vol. 5, no. 3, pp. 219-234. DOI: 10.1038/nrd1984.

21. Borst P., Evers R., Koel M., Wijnholds J. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92, no. 16, pp. 1295-1302. DOI: 10.1093/jnci/92.16.1295.

22. Krizkova S., Fabrik I., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Kizek R. Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratislavske Lekarske Listy*, 2009, vol. 110, pp. 93-97.

23. Pedersen M.O., Larsen A., Stoltenberg M., Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2009, vol. 44, pp. 29-64. DOI: 10.1016/j.proghi.2008.10.001.

24. Moore A., Pinkerton R. Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr. Blood Cancer*, 2009, vol. 53, pp. 1180-1187. DOI: 10.1002/pbc.22161.

25. Кобляков В.А. Цитохром Р-450: Функционирование и регуляция. *Биол. мембраны*, 2003, т. 20, № 3, с. 265-272. [Kobliakov V.A. Cytochrome P-450: Functions and regulation. *Biol. membranes*, 2003, vol. 20, no. 3, pp. 265-272. (In Russ.)]

26. Cole Susan P.C. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, no. 45, pp. 30880-30888. DOI: 10.1074/jbc.R114.609248.

EXPRESSION OF TRANSPORT AND CYTOSOLIC PROTEINS UNDER THE FORMATION OF MULTIDRUG RESISTANCE IN HUMAN MYELOMA CELLS *IN VITRO***Tamashevski A.V.¹, Harmaza Y.M.¹, Pasiukov V.V.², Slobozhanina E.I.¹**¹ Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus*Akademicheskaya st. 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: Tayzoe@mail.ru*² Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies MH RB*Dolginovsky tract 160, Minsk, 220053, Belarus*

Abstract. The estimation of transport proteins associated with the phenomenon of multidrug resistance (P-glycoprotein and the protein of multidrug resistance - MRP1) amount and the cysteine-containing low-molecular-weight proteins metallothioneins level of expression in donor's lymphocytes, B-lymphoblastoid cell line IM9 and its subline resistant to fludarabel were conducted. It was found decrease in the ratio of expression of P-glycoprotein to MRP1 in IM9 subline resistant to fludarabel relative to IM9 parental cell line. So, one of the mechanisms contributing to the development of multidrug resistance in the IM9 cell line, equally with increase of MRP1 protein importance, take place cysteine-enriched cytosolic proteins metallothioneins I/II classes activation as was found.

Key words: *cell line IM9, multidrug resistance proteins P-glycoprotein and MRP1, metallothioneins, anticancer drugs.*

МИКРОВОЛНОВЫЕ ИЗЛУЧЕНИЯ В ОНКОЛОГИИ: О ВОЗМОЖНОСТИ ТОРМОЖЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО МИТОЗА

Авакян С.В.¹, Баранова Л.А.²

¹ Всероссийский научный центр «Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова»

Биржевая линия 10, Санкт-Петербург, 199034, РФ

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН

Политехническая ул., 26, Санкт-Петербург, 194021, РФ; e-mail: l.baranova@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию: 28.07.20

Аннотация. Рассмотрены известные экспериментальные результаты по влиянию на митоз раковых клеток двух факторов: - искусственно создаваемой невесомости; - потока микроволнового излучения из ионосферы Земли. Представлена интерпретация этих результатов в рамках супрамолекулярной физики. Рассмотрена генерация надмолекулярных структур (водосодержащих ассоциатов) в живом организме с учётом: - переноса протона в акте водородной связи из-за высокой степени сродства к протону у молекул воды; - поглощения кванта микроволн электроном на ридберговской орбитали, возбуждённым в это состояние при его захвате в процессе нейтрализации заряда, привнесённого протоном, что обеспечивает рост выхода стабильных водосодержащих ассоциатов; - генерации индуцированного микроволнового излучения в среде живого организма, образующего в нём направленное биополе; - образования, в процессах столкновений с водосодержащими ассоциатами, высоковозбуждённых ридберговских молекул биоматериалов живой среды. Обсуждены предложения по медицинскому применению облучения опухолей потоком микроволн с пространственно-временной модуляцией, на экологически безопасном природоподобном уровне, в целях возможного торможения злокачественного деления клеток с учётом протонного переноса, появления в биосреде ридберговских молекул и возникновения при индуцированном излучении направленного биополя.

Ключевые слова: ассоциатообразование биорастворов, микроволновое облучение из ионосферы, индуцированное и спонтанное излучения

Введение.

Одной из кардинальных проблем современной медицинской биофизики является отсутствие достаточного понимания биоэнергетики живого организма [1-3]. В первую очередь это касается механизмов воздействия внешних электромагнитных полей на водную среду организмов. Так что до сих пор актуально рассмотрение предположения Альберта фон Сент-Дьёрди, нобелевского лауреата по физиологии, сформулированного 60 лет назад, что «*взаимодействие между молекулами могут происходить без непосредственного вещественного контакта, либо посредством энергетических связей, либо посредством электромагнитного поля, которое, таким образом, представляется матрицей биологических реакций*» [3], стр. 150.

Сегодня этот вопрос, в условиях сильно возрастающего электромагнитного загрязнения окружающей среды из-за прогресса в бытовой электронике и связи, ещё более актуален. Решение для этой задачи в широком диапазоне микроволн (в области длин волн от 1 мм до 10 дм, т.е. в диапазоне частот от 300 до 0,3 ГГц электромагнитного спектра: КВЧ-СВЧ-УВЧ) представлено в [1, 4, 5], где использован механизм, предложенный в рамках вновь развиваемой супрамолекулярной физики, названной по аналогии с известной супрамолекулярной химией – химией за пределами молекулы, изучающей организованные ансамбли более высокого уровня сложности, такие как ассоциаты двух (и более) молекул, удерживаемые межмолекулярными силами [6], стр. 22. Итак, супрамолекулярная физика – физика надмолекулярных структур за пределами молекулы, в эволюции которой в кластеры-ассоциаты участвует микроволновое излучение внешнего происхождения, поглощаемое ридберговски возбуждёнными составляющими молекулярного комплекса с увеличением его стабильности. В [1, 4, 5, 7] выполнена проверка адекватности развиваемых нами представлений с квантовомеханическими оценками при сравнении с экспериментальными данными, полученными ранее для тропосферных водосодержащих кластеров [8]. В [9] предложено рассматривать механизм [1, 2, 4, 5], как первичный акт водородной связи в химии.

Тем самым, мы полагаем, что фактически удалось предложить физическое решение проблемы, поднятой ещё в [3], по учёту влияния электромагнитных полей на водную среду живого организма. В нашем подходе задействованы и вода организма, и электромагнитное (микроволновое) поле окружающей среды [1, 2, 4, 5], в первую очередь – ионосферно-космической природы.

Основой нашего подхода явились результаты [10-12], где предложен механизм образования полиатомных ридберговских молекул, в том числе из молекулы воды, с учётом экспериментов в области физической оптики, проведённых, в [11, 12]. При этом в [12] подчёркивалось, что исследования проводились как в газовой, так и в жидкой фазах, а подробнее о регистрации в жидкой фазе ридберговски возбуждённых молекул, в том числе воды, в публикациях 1974-2004 гг., говорилось в [5]. Наконец, современного уровня экспериментальная работа по исследованию спектра ридберговских состояний в жидкой воде [13] может рассматриваться как дополнительное экспериментальное доказательство о существовании таких высоковозбуждённых состояний в жидкой среде

живого организма. Это снимает, по-видимому, окончательно вопрос о том, что развиваемая нами супрамолекулярная физика относится преимущественно к «разреженным» средам. Для биологов это есть новое подтверждение того, что ридберговские состояния с очень (вплоть до ~ 10 эВ) высокими энергетическими уровнями возможны и в водосодержащих биорастворах живого организма.

Согласно [10], в случае ассоциации, т.е. образования сложных молекулярных комплексов, добавление новых молекул к прародительским молекулам идёт благодаря их высокому сродству к протону. Образующиеся положительные ионы нейтрализуются захватом электрона на ридберговскую орбиталь с высокими значениями главного квантового числа n . В этих ситуациях вероятность процессов ассоциации определяется значением величины орбитального момента (l) ридберговского электрона: она уменьшается при малых величинах l и, наоборот, велика при больших значениях $l > 2$, при этом, согласно правилам отбора, рост l на единицу происходит при каждом поглощении кванта микроволнового диапазона от любого внешнего источника. Дело в том, что при увеличенных значениях l орбита электрона реже проходит в ионный остов, что уменьшает вероятность развала образующегося ассоциата [14, 15]. Таким образом, под воздействием потока микроволн ионосферного, либо антропогенного происхождения, включая, по-видимому, средства мобильной связи и бытовой электроники, происходит увеличение ассоциатообразования в водных растворах живых организмов.

Указанные публикации используются в настоящей работе для достижения объявленной в названии цели – представлению предложений по возможному торможению деления злокачественных клеток в живом организме. В задачу исследования входило определение предпосылок такой возможности и основных деталей схемы действий. Нами обращается внимание на взаимообусловленность образования микроволнового «вектора биополя» и генерации супрамолекулярных ассоциатов в живой среде с участием молекул воды и биополимеров. Концепция клеточных биополей (внутри и между клетками) привлекалась в [16] в контексте способности задавать направление в «формообразовании», т.е. в регенерации утраченных органов и заживлении ран в живом организме, а также в делении раковых клеток. Она подкреплялась результатами оптико-биофизических экспериментов А.Г. Гурвича [17], в которых были обнаружены в начале прошлого века «митогенетические лучи» в живом организме, т.е. излучение, сопровождающееся процессы роста и деления клеток. Можно предположить важный вклад в это явление именно рассматриваемых нами процессов с участием таких, неучитываемых ранее физических механизмов, как возбуждение ридберговских состояний воды и биоматериалов, и спонтанное излучение, помимо индуцированного, с этих состояний, лежащее как известно в очень широкой области электромагнитного спектра, включая диапазон от УФ до радиоволн. Именно в УФ-, видимом и ИК-спектральных интервалах это явление в дальнейшем продолжало подробно изучаться, прежде всего в нашей стране [18], с. 166.

Ниже предлагается возможное общее модельное описание физической природы явления «митогенетических лучей». При этом авторы не претендуют на полное рассмотрение деталей этого явления, а считают необходимым прежде всего – на этом, первом этапе, создать оригинальную, физически адекватную картину и предложить полностью непротиворечивое пошаговое модельное представление на основе разработанного подхода (в рамках развиваемой нами супрамолекулярной физики ассоциатообразования в биосредах с участием молекул воды). Для обеспечения физической непротиворечивости общему смыслу явления, мы констатируем, что наш подход целиком и полностью соответствует, по-видимому, предположению А.Г. Гурвича [17] о природе носителей эффекта как «...ассоциации химически несвязанных молекул, существование которых поддерживается непрерывным поступлением энергии». Мы действительно всегда привлекаем внешний источник «непрерывного поступления энергии» к исследуемым образцам биосред. Это поток микроволн от земной ионосферы, меняющийся, во-первых, с изменением времени суток от дня к ночи, а во-вторых, что самое главное, спорадически резко возрастающий (до тысяч раз в мировую магнитную бурю) при солнечно-геомагнитных возмущениях. Кроме того, это и микроволновая (прежде всего – миллиметровая) часть потока теплового фонового излучения в лабораторном помещении при 300 К [19], очевидно, с вкладом температурного излучения от персонала. Величина такого СВЧ-излучения по данным [20] может быть того же порядка, что дают и наши оценки потока из ионосферы при сильных возмущениях.

Следует напомнить, что по [16], стр.188/190, крайне важно «стимулирующее действие митогенетических лучей» ... на этапе... «подготовки к митозу и самому циклу митоза, которые, как мы знаем, можно охарактеризовать как наиболее яркое проявление «структурированных процессов»». Поэтому структурирование, включающее ассоциатообразование, – определяющий процесс в явлении А.Г. Гурвича.

Итак, схему явлений А.Г. Гурвича предлагается описать как совокупность следующих последовательных событий с участием механизма поглощения электромагнитного (микроволнового) излучения в веществе живого организма, содержащим молекулы воды, т.е. водных биосред:

1). Протонный перенос между молекулами воды [10-12] с появлением возбуждённого электрона, захватываемого всегда на ридберговскую высоковозбуждённую орбиталь в процессе нейтрализации положительного заряда вновь образованного агрегата с протоном.

2). Поглощение кванта микроволн из потока внешнего происхождения, приводящее к переходу ридберговского электрона на уровень с увеличенным на единицу значением орбитального квантового числа l , что обеспечивает рост вероятности образования стабильного ассоциата.

3). Возникновение индуцированного излучения (испускания) квантов той же частоты и в том же направлении, что имело микроволновое излучение внешнего происхождения.

4). Спонтанное излучение квантов УФ-, видимого и ИК-диапазонов, в электрических дипольных переходах с ридберговских состояний с максимумом интенсивности, возникающем при изменениях из nl в состояние $n'=l$,

$l'=l-1$ [21], с.183. Напомним, что вероятность спонтанных переходов много ниже, чем вероятность индуцированных, но всегда имеет место [10, 19]. Вообще, по [22], стр. 424/5, обычно вероятности излучательных переходов больше в тех случаях, когда n и l изменяются в одинаковом направлении (это как раз наш случай). Кроме того, при больших l вероятность перехода выше для $\Delta n = 1$, чем $\Delta n \geq 2$. Но следует также учитывать, что, благодаря квадратичной зависимости от частоты перехода, они имеют относительно большие значения для переходов между далеко отстоящими уровнями.

Мы предполагаем, что микроволновая составляющая биополя формируется внутри организма как поток при индуцированном испускании квантов той же частоты, в том же направлении, что имело излучение внешнего происхождения. Это обусловлено тем фактом [10, 19], что кванты микроволновой частоты между ридберговскими состояниями уже в мм-диапазоне (а тем более, в длинноволновых: см- и дм- спектральных интервалах) практически полностью попадают в область излучения, где очень велики матричные элементы электрических дипольных переходов между соседними уровнями (из-за их крайне близкого расположения). А одновременно наблюдаемое в серии экспериментов типа [16, 17] широкополосное оптическое (в УФ-, видимом и ИК- диапазоне) излучение [18], стр. 165, генерируется по нашему мнению в спонтанных электрических дипольных переходах (в соответствии с известным с 1917 г. уравнением Эйнштейна см., например, [22], стр. 394) с ридберговских состояний с максимумом интенсивности при изменениях: из nl в состояние $n'=l$, $l'=l-1$ [21]. Итак, к спонтанному излучению, по-видимому, можно отнести в большой мере и «митогенетические лучи» [19]. Напомним, что вероятность спонтанных переходов при данном n сильно зависит [23] от величины l . При малых l радиационное время жизни пропорционально n^3 , а при высоких l оно пропорционально уже n^5 , т.е. для малых l время жизни много меньше, чем для больших. Это в первом приближении означает, что (при прочих близких условиях) испускание УФ-квантов происходит в n^5/n^3 раз чаще, чем ИК-квантов, т.е., например, уже при $n \sim 10$, выход УФ-квантов будет на два порядка выше, чем ИК-квантов. В [16] как раз и получено, что УФ-излучение составляет основную часть «митогенетических лучей». Важно, что этим «митогенетическим лучам» приписывалось участие в «формообразовании», т.е. в регенерации утеранных органов и заживлении ран в живом организме, а также в делении раковых клеток [16, 17]. По [24], стр. 380, «задача формообразования – главная проблема биологии XXI века».

Ассоциатообразование в водных биорасборах при микроволновом облучении.

В предлагаемом подходе к биофизике водных биорасборов [1, 2, 4, 5, 9] в рамках учёта известных квантово-электронно-молекулярных процессов:

- задействованы и вода организма и электромагнитное поле окружающей среды;

- введены механизмы индуцированного испускания электромагнитного (микроволнового: КВЧ-СВЧ-УВЧ) излучения и столкновительной безызлучательной передачи энергии возбуждения от водных ассоциатов к молекулам биоматериалов, включая ДНК, в жидкой среде [5].

Предложенные физические механизмы детально разрабатывались, начиная с 2004-2007 гг. в ГОИ им. С.И. Вавилова в рамках программы исследований в области физики солнечно-земных связей с учётом нового фактора воздействия – микроволнового излучения земной ионосферы, в том числе, в периоды проявлений солнечной вспышечной активности и при геомагнитных бурях [25].

Почему понадобилось учитывать потоки микроволн из ионосферы? Дело в том, что в многочисленных космических экспериментах к настоящему времени усилиями мировой науки определены вариации всех энергетических потоков, связанных с солнечной и геомагнитной активностью [26, 27]. Полученные результаты свидетельствуют, что эти потоки не доходят до нижней атмосферы и, следовательно, прямое воздействие эффектов солнечных вспышек и магнитных бурь на биосферу и нижние слои атмосферы (тропосферу и её погодно-климатические характеристики) невозможно. В то же время в десятках отечественных и зарубежных радиофизических измерениях на наземных обсерваториях обнаружено микроволновое излучение земной ионосферы в периоды солнечных вспышек и магнитных бурь (полярных сияний) (например, [28, 29]), но его природа была неопределена. Мы предложили [30], в качестве модельного механизма генерации этого излучения, учитывать известный, как наиболее эффективный, канал возбуждения ридберговских состояний атомов и молекул для газов верхней атмосферы – электронный удар быстрыми электронами. Они возникают при ионизации ионосферы потоком рентгеновского и крайнего УФ излучения солнечных вспышек [30] и (в периоды магнитных бурь) потоками электронов, высыпавшимися из радиационных поясов Земли и прямо из геомагнитосферы. Микроволновое эмиссионное излучение генерируется в разрешённых электрических дипольных переходах между подуровнями тонкой структуры высоковозбуждённых – ридберговских уровней при $n \geq 10$ (где n – главное квантовое число) с изменением (уменьшением) орбитального квантового числа (l) на единицу, а также и в переходах с небольшим уменьшением n [25].

Наземные измерения в СССР [29] показали, что в период солнечных вспышек сигнал от потока микроволнового излучения земной ионосферы превышал интенсивность потока микроволн от спокойного Солнца в 2-40 раз (на длине волны 50 см). Ширина всплеска достигала 1 ГГц. Тогда поток ионосферного микроволнового излучения на длине волны 50 см в период солнечной вспышки составляет по данным измерений [29] $\sim 3 \cdot 70 \cdot 10^{-16}$ Вт/см². Во время магнитных бурь такие наблюдения проведены в зоне полярных сияний [28]. В период магнитной бури величина потока может возрастать до $10^{-11} - 10^{-12}$ Вт/см² [31]. Это на порядки выше, чем порог чувствительности биологических объектов к микроволнам [32], с. 142.

Источники спорадического усиления потока микроволн из ионосферы связаны в основном с авроральной возмущённостью. Она как известно наиболее сильна в области овала полярных сияний ($\sim 67^\circ$ геомагнитной

широты), где сияния наблюдаются практически постоянно [33], варьируя по интенсивности на 4 порядка. При мировых магнитных бурях возникает второй максимум на средних широтах (связанный с высыпаниями электронов из радиационных поясов), что надёжно зарегистрировано в долговременных пилотируемых космических полётах [33]. Непосредственными наземными измерениями потока СВЧ-излучения ионосферы этот факт подтверждается [34].

Важным в учёте источника микроволн в ионосфере для физики солнечно-земных связей в приложении к биофизическим проблемам, являются два обстоятельства:

1) поток микроволнового ионосферного излучения пропорционален по энергетике как мощности вспышки, так и силе бури, то есть хорошо отражает степень текущей солнечно-геомагнитной активности;

2) весь спектр микроволнового излучения солнечного и ионосферного происхождения почти свободно (за исключением пяти узких полос поглощения) проникает до земной поверхности, в том числе в биосферу.

В то же время наш новый подход позволил учитывать роль молекул воды при решении самых важных проблем современной физики солнечно-земных связей:

- влияния мировых магнитных бурь на состояние жидких сред в организме человека и

- вклада в современное глобальное потепление климата парникового эффекта на оптически тонкой (разогревающей воздух приземных слоёв тропосферы) облачности. Действительно, как регистрируемое последние десятилетия глобальное повышение приземного воздуха [35], так и многочисленные фактические данные о роли солнечных вспышек и геомагнитных бурь в ухудшении самочувствия человеческого организма, ослабленного различными болезнями, являются предметом повышенного внимания физиков, биофизиков и медиков.

Однако, до наших работ не было реальных результатов как по учёту парникового эффекта на парах воды в тропосфере, так и оценки количественных эффектов по вкладу структурирования водной среды в живом организме, хотя именно молекулы воды являются основным парниковым газом в тропосфере, а в организме человека жидкой воды 70 % и более по объёму и более 90 % по количеству молекул.

Возможная роль потока микроволн ионосферно-космической природы в эволюции земной жизни.

Происхождение земной жизни со времени зарождения и всю дальнейшую её эволюцию нами предложено рассматривать с учетом микроволнового излучения ионосферно-космической природы [36]. Это обосновывается результатами проведённого в [36] анализа, где учитываются известные подходы к модельным описаниям зарождения и эволюции жизни как непосредственно на ранней Земле, так и при ее внесении из космоса (в атмосферах и ядрах комет, на астероидах и в метеоритах). Микроволновое излучение земной ионосферы воздействует всегда – как в спокойных условиях, так и в любые периоды увеличения потоков той ионизирующей радиации из космоса, которая поглощается в земной верхней атмосфере, при этом оно способно влиять на величину концентрации сложных надмолекулярных структур. Это происходит благодаря непрерывному возбуждению высоковольтных состояний электрона, захватываемого кулоновским полем при нейтрализации положительного заряда образующегося ассоциата. Поэтому такой электрон способен поглощать кванты внешнего поля микроволн: из окружающей среды, прежде всего, приходящие из ионосферы, а также, например, микроволнового солнечного излучения. При этом совокупность уже выполненных экспериментов подтверждает, что микроволновое излучение, особенно наиболее низкой интенсивности и с амплитудной модуляцией на частотах в единицы и десятки Гц, вызывает устойчиво наблюдаемые эффекты ассоциации при синтезе органики, а также биоэффекты в живых средах: от стимулирования роста цианобактерий (по-видимому, первых живых существ на древней Земле), прокариотных и эукариотных фотосинтезирующих организмов [37].

Для целей нашей работы важно, что раннее («молодое») Солнце излучало поток мягкого рентгеновского и крайнего УФ излучения примерно в сотни-тысячу раз сильнее [38] (в сравнении с нынешним Солнцем). Такие потоки дают ионосферные возмущения в степени ионизованности среды в несколько десятков раз, а, согласно нашим оценкам [36], в степени оптического и микроволнового (ридберговского) возбуждения ионосферы – до 500 раз. Однако в жизни Солнца, как и других звезд подобного типа, не известно серьезных катаклизмов, а идет постепенная эволюция. Поэтому, очень важно, что если ионизирующая и проникающая радиация обычно ведет к разрушению организмов в биосфере, то микроволновое излучение способно зарождать жизнь через стимуляцию процессов образования сложного из более простого.

Из представленного в [36] анализа следуют выводы, очень важные для определения возможностей управления торможением клеточного деления в злокачественном и доброкачественном митозе под воздействием микроволновых потоков природоподобного уровня:

1). Эпохе появления и эволюции земной жизни соответствовала пониженная интенсивность ГКЛ – основного естественного фактора, ответственного за оптимальную интенсивность образования значимых мутаций в клетках в современных условиях. Поэтому заведомо низкие величины микроволновых потоков, которые планируется применять при предлагаемой терапии, позволяют рассчитывать, что незлокачественные, здоровые клетки не будут реагировать на таком же уровне, учитывая их благоприобретённую приспособленность к изменению стимулов окружающей среды, включая возмущения в земной ионосфере, выработанную в процессе эволюции.

2). Жизнь на Земле всегда испытывала воздействие микроволнового потока из ионосферы, на абсолютном уровне и с величиной вариаций, не меньшими (а как правило, большими), чем в настоящее время.

Высокий уровень потока микроволн от раннего Солнца и, особенно, из ионосферы, наличие почти наивысших значений сродства к протону у основных компонентов (молекул воды, аммиака и метана) гипотетической атмосферы на древней Земле, позволяют нам предлагать возможность физико-химической самоорганизации в её атмосфере и водоёмах по сценариям супрамолекулярных химии, физики и биофизики [9]. Кстати, верхние слои воды любых открытых водоёмов находятся под перманентным облучением микроволнами ионосферно-космической природы на глубинах как минимум от долей мм до полутора десятков см (в положительной зависимости от значения длины радиоволны).

Торможение злокачественного митоза микроволновым облучением.

В [39], стр. 4, так сформулирован парадокс современной онкологии: *«три активных рычага снижения смертности (профилактика, ранняя диагностика и адекватное эффективное лечение) не работают или малоэффективны, несмотря на колоссальные интеллектуальные и финансовые усилия...»*. В итоге авторами обосновывается необходимость профилактики метастатической болезни уже на самых ранних этапах лечения. Но в большинстве случаев врач-онколог определяет наличие опухоли на 7–10-м году бессимптомного, скрытого роста до размера $\sim 1 \text{ см}^3$, что диктуется реальными возможностями современной диагностики [39]. При этом, хирургическая травма при удалении первичной опухоли может сопровождаться активацией дормантных («дремлющих») опухолевых клеток [39]. Поэтому, по нашему мнению, наиболее актуальным является именно развитие новых неинвазивных методов эффективного лечения, включая и способы торможения процесса деления раковой клетки микроволновым облучением.

Нами предлагается попытаться затормаживать процесс злокачественного деления клеток облучением микроволнами, когда возрастает величина орбитального квантового числа l . Это как показано в [1, 2, 4, 5, 14, 15] ведёт к росту выхода ассоциатов. Облучение микроволнами одновременно увеличивает и когезию – сцепление, притяжение молекул в биосреде, обусловленную межмолекулярным взаимодействием высоковозбуждённых ридберговских атомно-молекулярных частиц, которые обладают большой поляризуемостью [40]. Такой вывод ранее был обоснован квантовомеханическими оценками при описании возможной природы шаровой молнии [41]. Итак, облучение микроволнами, во-первых, ускоряет процесс ассоциатообразования в водных биорастворах, во-вторых, увеличивает их когезию. *«Раковые клетки обладают более низкой степенью организации, а вместе с этим и меньшей степенью структурности воды»* [42], с. 148, в них также низкая когезия, поскольку она *«...характерна для активного состояния (интенсивного деления), тогда как высокая – для состояния покоя»* [43], с. 67. Важно, что автор [3, 42] – Альберт фон Сент-Дьёрдьи предвидел фактически наш подход в рамках супрамолекулярной физики (т.е., с включением в процесс ассоциатообразования перенос протона и захват электрона, нейтрализующего возникающий от появления протона положительный заряд, на высоко лежащую ридберговскую орбиту): *«Представление о переносе заряда вводит в игру возбуждённые уровни, ранее считавшиеся недоступными, ибо обычно энергия, необходимая для подъёма электрона на возбуждённый уровень молекулы, к которой он принадлежит, слишком велика»* [43], с. 69, при этом обсуждалась возможность (стр. 99-100), что *«массивность реагирующих молекул благоприятствует переносу заряда»*. В рамках супрамолекулярной физики действительно ридберговский электрон оказывается сразу на энергетическом уровне $\sim 10 \text{ эВ}$ и ридберговская молекула как водного ассоциата, так и биоматериалов сравнительно велика.

Эксперименты микроволновой терапии с низкочастотной модуляцией.

Микроволновое излучение давно используется при физиотерапии, при этом показано, что:

1). Более эффективно импульсное микроволновое излучение. Одной из первых работ в этом направлении была [44], где излучение источника микроволн с частотой 30-300 ГГц низкой интенсивности (от 50 мкВт) могло модулироваться в широком интервале низких частот от 1 до 1000 Гц. Лечение импульсным ЭМП показывает лечебный эффект 77-85 % (при восстановлении соединительной ткани) [45]. При этом наиболее широко изученное применение касается восстановления костей и ускорения заживления свежих переломов, отсроченных и несращённых, костных трансплантатов, остеопороза и остеонекроза, а также восстановление хряща и мягких волокнистых тканей. Во всех этих экспериментальных системах и клинических применениях наблюдалось ускорение синтеза внеклеточного матрикса и заживления тканей. В [46] подтверждено в рамках экспериментов, стимулирующее влияние модуляции на частотах менее 100 Гц при облучении микроволнами на процессы развития патологических эффектов. Позднее в [47] показано воздействие низкоэнергетического импульсного СВЧ-излучения наносекундной длительности с большой пиковой мощностью различной длины волны на ионный транспорт, проницаемость клеточных мембран, процессы агрегации клеток и развития злокачественных образований. В недавнем исследовании Global Quantech [48] подтверждается, что облучение низкоинтенсивными ЭМИ вызывает торможение роста опухоли и подавление жизнеспособности раковых клеток более чем в 1,5 раза за счёт молекулярного структурирования водной среды живого организма;

2). Важна, как это следует из нашей концепции, геометрическая направленность микроволнового воздействия, обуславливающая эффект заданности направления в вынужденном испускании потока микроволн в живой среде. В этой связи вызывают интерес детали недавних экспериментов по влиянию искусственной невесомости на гибель до 90 % раковых клеток [49]. Автор этих исследований Dr. Joshua Chou (University of Technology Sydney) считает, что в них нарушается общность – коммуникация клеток друг с другом: *«...it stops them communicating with each other»*. В [50] приведены результаты по исследованию механизмов клеточной гравиточувствительности. Эти лабораторные модели для экспериментов с культивируемыми клетками обычно всегда включают [50], с. 39, однонаправленное или разнонаправленное вращение исследуемого объекта вокруг одной или нескольких осей: быстрое (90 об/мин), и медленное (6-10 об/мин). В условиях орбитальных

космических полётов, т.е. также в отсутствии силы тяжести, неоднократно проводились эксперименты на определение влияния невесомости на раковые клетки, но снижение их жизнеспособности ненамного превышала 10-15 %. Такие количественные различия результатов наземного [49] и орбитальных экспериментов связаны, в соответствии с концепцией супрамолекулярной физики, по-видимому, с превалирующей ролью наличия облучения направленными потоками микроволн. Для использования указанных экспериментальных фактов в настоящей работе при обосновании конкретных предложений по возможности торможения деления злокачественных клеток требуется более подробная информация о степени экранировки от потока ионосферных микроволн. Важным является наличие или отсутствие металлического контейнера в первом случае и расположение экспериментальных образцов на борту космической станции относительно иллюминаторов, прозрачных для ионосферного потока микроволн во втором случае, поскольку орбитальные полёты всегда проходят в пределах земной ионосферы. Внутри Международной космической станции также формируется свой суммарный переменный направленный поток микроволн от компьютеров, функциональной, научной и бытовой техники, средств микроволновой связи. Это и микроволновая (прежде всего - миллиметровая) часть потока теплового фонового излучения в лабораторном отсеке с вкладом температурного излучения от персонала. В последнем случае, величина такого СВЧ-излучения по данным [20] может быть того же порядка ($\sim 10^{-11}$ Вт/см²•ГГц), что дают и наши оценки [4, 5] потока из ионосферы при геофизических возмущениях (вплоть до $\sim 10^{-10}$ Вт/см²). Всё это экологически безопасные, природоподобные уровни, кроме того, выполняется условие близости интенсивностей потоков, необходимое для возможного участия явления стохастического резонанса в усилении эффекта облучения в узкой полосе от антропогенно обусловленного источника микроволн за счёт сбора энергии естественного электромагнитного эмиссионного (микроволнового) излучения возмущённой земной ионосферы [51, 52].

Заключение.

1. В рамках современного прочтения гелиобиологии – науки, развитой столетие назад великим российским учёным А.Л. Чижевским, предложен новый агент солнечно-земных связей: микроволновое излучение земной ионосферы. Оно существует практически постоянно, спорадически возрастающая в периоды повышения уровня солнечно-геомагнитной активности, в особенности при магнитных бурях и вспышках на Солнце. Нами уже более двух десятилетий ведутся исследования по введению этого агента солнечно-земной физики для учёта его роли в ассоциатообразовании молекул воды при решении самых актуальных проблем современной физики солнечно-земных связей: влияния мировых магнитных бурь и солнечных вспышек на состояние жидких сред в организме человека, и на формирование оптически тонкой (и всегда разогревающей воздух приземных слоёв тропосферы) облачности, вносящей важный вклад в современное глобальное потепление.

2. До наших работ не было практических результатов как по учёту парникового эффекта на парах воды в тропосфере, так и количественной оценки вклада структурирования водной среды в живом организме [2, 5], хотя именно молекулы воды являются основным парниковым газом в тропосфере, а в организме человека жидкой воды более 70 %. В статье представлен подход к биофизическим проблемам на основе известных квантово-электронно-молекулярных процессов из физической оптики [1, 2, 4, 5, 7, 31]. При этом рассмотрены и вода организма и электромагнитное (микроволновое) поле окружающей среды, и впервые введены в биофизику механизмы: индуцированного испускания строго направленного электромагнитного (микроволнового: КВЧ-СВЧ-УВЧ) излучения в жидкой среде живого организма, а также и процессы столкновительной безызлучательной передачи потенциальной энергии ридберговского возбуждения от водных ассоциатов к молекулам биоматериалов, включая ДНК.

3. Проведённое в статье исследование ряда экспериментальных результатов, опубликованных в последние десятилетия, а также учёт оригинального подхода к биофизическим механизмам при электромагнитном облучении водосодержащих биосред живого организма [1, 2, 4, 5], привёл нас к выводу о перспективности постановки работ по определению эффективных модуляционных частот и амплитуд для природоподобных, соответствующих по интенсивности ионосферным, уровней потока микроволнового воздействия, которые могут оказаться способными затормаживать митоз злокачественных клеток в каждом органе. Заведомо низкие величины потоков, применяемые при таком лечении, позволяют рассчитывать, что незлокачественные, здоровые клетки не будут реагировать аномальным режимом пролиферации, учитывая их приспособленность к изменению стимулов окружающей среды, выработанную в процессе эволюции на фоне относительно низкого естественного мутационного эффекта, создаваемого ГКЛ на древней Земле. Поэтому, согласно нашей концепции (в рамках супрамолекулярной физики) раковая клетка, по-видимому, будет более восприимчива к терапии микроволнами с эффективными частотами и амплитудами модуляции, чем здоровая. Зарегистрированные в [45] в экспериментальных системах и клинических применениях эффекты ускорения синтеза внеклеточного матрикса и заживления тканей позволяют также рассчитывать, что микроволновое облучение в эффективном терапевтическом режиме снизит уровни тех опухолевых воспалений, которые часто затрудняют противораковую терапию [39]. Кроме того, поскольку хирургическая травма при удалении первичной опухоли может сопровождаться активацией дормантных («дремлющих») опухолевых клеток, то, по-видимому, наиболее актуальным является именно развитие неинвазивных методов эффективного лечения, включая, по нашему мнению, и предлагаемые способы торможения процесса деления раковой клетки облучением потоком микроволн с пространственно-временной модуляцией.

Список литературы/References:

1. Avakyan S.V. *Supramolecular physics of the ionosphere - biosphere links*. In: Proc. of the 11th International School and Conference "Problems of Geocosmos" (Oct. 03-07, 2016, St. Petersburg, Russia). Eds. by V.S. Semenov, M.V. Kholeva, S.V. Apatenkov, N.Yu. Bobrov, A.A. Kostero, A.A. Samsonov, N.A. Smirnova, T.B. Yanovskaya. SPbSU. Saint Petersburg. *VVM Publ.*, 2017, pp. 180-186.
2. Avakyan S.V., Baranova L.A. *How does the geocosmos control the biosphere? 1. Formation of associates in high delited water biosolutions under the influence of the microwave flux from the ionosphere. 2. DNA, ionospheric microwaves and water*. In Books of Abstracts. 12th Int. Conf. and School "Problems of Geocosmos". (Oct. 8-12, 2018. St. Petersburg, Russia). Eds. by V.S. Semenov, S.V. Apatenkov, et al. SPbSU. Saint Petersburg. *VVM Publ.*, 2018, pp. 135-136.
3. Сент-Дьёрдьи А. *Биоэнергетика*. М.: Физматгиз, 1960, 155 с. [Szent-Györgyi, A. *Bioenergetics*. N.-Y. Acad. Press Inc., 1957. (In Russ.)]
4. Авакян С.В. Супрамолекулярная физика окружающей среды: климатические и биофизические эффекты. *Вестник РАН*, 2017, т. 87, № 5, с. 458-466. [Avakyan S. V. Environmental supramolecular physics: climatic and biophysical effects. *Herald Rus. Acad. Sci.*, 2017, vol. 87, no. 3, pp. 276-283. (In Russ.)]
5. Авакян С.В., Баранова Л.А. Влияние электромагнитного излучения окружающей среды на ассоциатообразование в водных растворах. *Биофизика*, т. 64, № 1, с. 12-20. [Avakyan S.V., Baranova L.A. The influence of environmental electromagnetic radiation on associate formation in aqueous solutions. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 7-13. (In Russ.)]
6. Лен Ж.-М. *Супрамолекулярная химия. Концепции и перспективы*. Новосибирск, Наука, 1998. [Lehn, J.-M. *Supramolecular chemistry. Concepts and Perspectives*. Weinheim, N.-Y., Basel, Cambridge, Tokio, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995.]
7. Авакян С.В., Девдариани А.З. Роль ридберговских состояний и микроволнового излучения в тропосферной кластеризации паров воды. *Оптический журнал*. 2016, т. 83, № 5, с. 327-328. [Avakyan S.V., Devdariani A.Z. The role of the Rydberg states and microwave radiation in the tropospheric clusterization of a water vapor. *Journal of Optical Technology*, 2016, vol. 83, no. 5, pp. 327-328. (In Russ.)]
8. Ивлев Л.С., Аэрозольное воздействие на климатические процессы. *Опт. атмосф. и океана*, 2011, т. 24, № 5, с. 392-410. [Ivlev L.S. Aerosol impact at the climate processes. *Optics of the atmosphere and ocean*, 2011, vol. 24, no. 5, pp. 392-410. (In Russ.)]
9. Avakyan S.V., Baranova L.A. *Molecular protonics and supramolecular chemistry, physics and biophysics. Invited Lecture*. Book of Abstracts of XXI Mendeleev Congress on general and applied chemistry, Symp. of UNESCO "Self-Assembly and Supramolecular Organization". Saint Petersburg, 2019, vol. 6, p. 216.
10. Gallas J.A.C., Leuchs G., Wallher H., Figger H. Rydberg atoms: high-resolution spectroscopy and radiation interaction-Rydberg molecules. *Adv. At. Mol. Phys.*, 1985, vol. 20, pp. 413-466.
11. Dabrowski I., Herzberg G. The electronic emission spectrum of triatomic hydrogen. 1. *Can. J. Phys.*, 1980, vol. 58, no. 8, pp. 1238-1249.
12. Herzberg, G. Rydberg molecules. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1987, vol. 38, pp. 27-56.
13. Elles C.G., Rivera C.A., Y. Zhang P.A., Pieniazek P.A., Bradforth S.E. *J. Chem. Phys.*, 2009, vol. 130, no. 8, p. 084501. DOI: 10.1063/1.3078336.
14. Bates D.R. Electron-ion recombination in an ambient molecular gas. *J. Phys. B. At. Mol. Phys.*, 1981, vol. 14, no. 18, pp. 3525-3534.
15. Авакян С.В. Физика солнечно-земных связей: результаты, проблемы и новые подходы. *Геомагнетизм и аэронавигация*, 2008, т. 48, № 4, с. 435-442. [Avakyan S.V. Physics of the solar-terrestrial coupling: results, problems, and new approaches. *Geomagn. Aeron.*, 2008, vol. 48, no. 4, pp. 417-424. (In Russ.)]
16. Гурвич А.Г. *Принципы аналитической биологии и теории клеточных полей*, М.: Наука, 1991, 288 с. [Gurwitsch A.G. *The principles of the analytic biology and the theory of cellular fields*. М.: Наука, 1991, 288 p. (In Russ.)]
17. Гурвич А.А. *Проблема митогенетического излучения как аспект молекулярной биологии*. Медицина, Л., 1968. [Gurwitsch A.A. *The problem of mitogenetic emission as aspect molecular biology*. L., Medicine, 1968. (In Russ.)]
18. Самойлов В.О. *Медицинская биофизика: Учебник для ВУЗов*. 3-е изд., СПб., СпецЛит (ВМА), 2013, 591 с. [Samoilov V.O., *Medical biophysics. Textbook for the Universities*. 3-rd edition. Saint Petersburg, SpetsLit, 2013, 591 p. (In Russ.)]
19. Haroche S., Raimond J.M., Radiative properties of Rydberg states in resonant cavities. *Adv. At. Mol. Phys.*, 1985, vol. 20, pp. 347-411.
20. Гуляев Ю.В. Физические поля и излучение человека: новые методы медицинской диагностики. *Наука и культура: избр. лекции*. СПб., БАН, 2009, с. 171-207. [Gulyaev Yu.V. The physical fields and radiation of human: new methods medical diagnostics. *Science and culture: The elect lectures*. Saint Petersburg, BAS, 2009, pp. 171-207. (In Russ.)]
21. Смирнов Б.М. *Возбуждённые атомы*. М.: Энергоиздат, 1982, 231 с. [Smirnov B.M. *Excited atoms*. М.: Energoizdat, 1982, 231 p. (In Russ.)]
22. Фриш С.Э. *Оптические спектры атомов*. Гос. изд-во физикомат. Литературы, М.-Л., 1963, 640 с. [Frish S. E. *Optical spectra of atoms*. Fizmatgiz, Moscow-Leningrad, 1963, 640 p. (In Russ.)]
23. Kleppner D. An introduction to Rydberg atoms. *Atoms in unusual situations* (Ed. J.P. Briand). NATO ASI. ser. B, 1986, vol. 143, pp. 57-76.

24. Галль Л.Н. *Физические принципы функционирования материи живого организма*. СПб, Изд-во Полит. Университета, 2014, 399 с. [Gall' L.N. *Physical principles at the functioning of the substance for living organism*. Saint Petersburg, Publishing-house of SPbPU, 2014, 399 p. (In Russ.)]
25. Avakyan S.V. *New possible mechanism of sporadic ionospheric radioemissions*. Abstracts of papers presented at the 25-th General assembly of URSL. August-Sept. France. G1. Ionospheric models and indices, 1996, p. 136.
26. Авакян С.В., Вдовин А.И., Пустарнаков В.Ф. *Ионизирующие и проникающие излучения в околоземном космическом пространстве. Справочник*. СПб, Гидрометеиздат, 1994, 501 с. [Avakyan S.V., Vdovin A.I., Pustarnakov V.F. *Near-Earth space ionization and penetration radiations. Handbook*. Saint Petersburg, Gidrometeizdat, 1994, 501 p. (In Russ.)]
27. Schmidtke G., Avakyan S. V., Berdermann J., Bothmer V., Cessateur G., Ciraolo L., Didkovsky L., Dudoc de Wit T., Eparvier F.G., Gottwald A., Haberreiter M., Hammer R., Jacobi N., Jakowski Ch., Kretzschmar M., Lilensten J., Pfeifer M., Radicella S.M., Schäfer R., Schmidt W., Solomon S.C., Thuillier G., Tobiska W.K., Wieman S., Woods T.N. Where goes the Thermospheric Ionospheric GEospheric Research (TIGER) Program do? *Adv. Space Res.*, 2015, vol. 56, no. 8, pp. 1547-1577.
28. Forsyth P.A., Petrie W., Currie B.W. On the origin of ten centimeter radiation from the polar aurora. *Can. J. Res.*, 1950, vol. 28, no. A3, pp. 324-325.
29. Троицкий В.С., Стародубцев А.М., Бондарь Л.Н., Зелинская М.Р., Стрежнева К.М., Китай М.С., Сергеева А.И. Поиск спорадического радиоизлучения космического пространства на сантиметровых и дециметровых длинах волн. *Известия ВУЗов. Радиофизика*, 1973, т. 16, № 3, с. 323-341. [Troitskii V.S., Starodubtsev A.M., Bondar' L.N., Zelinskaya M.R., Strezhneva K.M., Kitay M.S., Sergeeva A.I. Search for sporadic radio emission from cosmic space at centimetre and decimetre wavelengths. *Radiophys. Quant. Electron.*, 1973, vol. 16, no. 3, pp. 239-522. (In Russ.)]
30. Авакян С.В., Серова А.Е., Воронин Н.А. Роль ридберговских атомов и молекул в верхней атмосфере. *Геомагнетизм и аэронаука*, 1997, т. 37, № 3, с. 99-106. [Avakyan S.V., Serova A.E., Voronin N.A. The role of Rydberg atoms and molecules in the upper atmosphere. *Geomagn. Aeron.*, 1997, vol. 37, no. 3, pp. 331-335. (In Russ.)]
31. Авакян С.В., Воронин Н.А. Возможные механизмы влияния гелиогеофизической активности на биосферу и погоду. *Оптич. журн.*, 2006, т. 73 б, № 4, с. 78-83. [Avakyan S.V., Voronin N.A. Possible mechanisms for the influence of heliogeophysical activity on the biosphere and the weather. *J. Opt. Technol.*, 2006, vol. 73, no. 4, pp. 281-285. (In Russ.)]
32. Бинги В.Н. *Магнитобиология: Эксперименты и модели*. М., МИЛТА, 2002. [Binhi V.N. *The magnetobiology. Experiments and models*. Moscow, MILTA, 2002. (In Russ.)]
33. Авакян С.В., Евлашин Л.С., Ковалёнок В.В., Лазарев А.И., Титов В.Г. *Наблюдения полярных сияний из космоса*. Л., Гидрометеиздат, 1991, 229 с. [Avakyan S.V., Evlashin L.S., Kovalenok V.V., Lazarev A.I., Titov V.G. *The observations of aurora from space*. L., Gidrometeizdat, 1991, 229 p. (In Russ.)]
34. Буренин А.Н., Клименко В.В., Осипов Н.К., Чернов А.А. Радиоизлучение авроральной ионосферы в СВЧ-диапазоне и овал полярных сияний. *Геомагнетизм и аэронаука*, 1981, т. 21, № 2, с. 367-369. [Burenin A.N., Klimenko V.V., Osipov N.K., Chernov A.A. SHF radio emission of auroral ionosphere and the oval of aurora. *Geomagn. Aeron.*, 1981, vol. 21, no. 2, pp. 367-369. (In Russ.)]
35. Авакян С.В. Роль активности Солнца в глобальном потеплении. *Вестник Российской Академии наук*, 2013, т. 83, № 5, с. 425-436. [Avakyan S.V., The Role of solar activity in global warming. *Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2013, vol. 83, no. 3, pp. 275-285. (In Russ.)]
36. Авакян С.В. *Методология В.И. Вернадского, историометрия и гелиобиология А.Л. Чижевского, этногенез Л.Н. Гумилёва и современная солнечно-земная физика*. В сб. «В.И. Вернадский и ноосферная парадигма развития общества, науки, культуры, образования и экономики в XXI веке: коллективная монография» под научной ред. А.И. Субетто и В.А. Шамахова, 2013, т. 2, с. 245-256, СПб., Астерион. [Avakyan S.V. *Methodology of V. I. Vernadsky, historiometricity and heliobiology of A.L. Tchijevsky, ethnogenes of L. N. Gumilev and the modern solar-terrestrial physics*. In Proc. "V.I. Vernadsky and noospheric paradigm of the development of the society, science, culture, edication and economics at XXI century: collective monography". Scientific Eds. by A. I. Subetto and V.A. Shamahov, 2013, vol. 2, pp. 245-256. Saint Petersburg. Asterion (In Russ.)]
37. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Бецкий О.В., Гуляев Ю.В. *Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы*. Ред. Гуляев Ю.В., Тамбиев А.Х. М.: Радиотехника, 2003, 176 с. [Tambiev A.H., Kirikova N.N., Betsky O.V., Gulyaev Yu.V. *Millimeter waves and photosynthesis organisms*. Eds. Gulyaev Yu.V., Tambiev A.H. M.: Radiotehnics, 2003, 176 p. (In Russ.)]
38. Tehrany M. G., Lammer H., Selsis F. et al. *The particle and radiation environment of the early Sun*. The 10th European Solar Physics Meeting, 9 - 14 Sept. 2002. Prague. Czech Republic. Ed. A. Wilson. ESA SP-506. Noordwijk. ESA Publications Division, 2002, vol. 1, pp. 209-212.
39. Ашрафян Л.А., Киселёв В.И. *Современная онкология, молекулярная биология и перспективы эффективной терапии*. М.: Молодая гвардия, 2015, 96 с. [Ashrafyan L.A., Kiselev V.I. *Modern oncology, molecular biology and the perspectives of effective therapy*. M.: Molodaya gvardiya, 2015, 96 p. (In Russ.)]
40. Gallagher T. Rydberg atoms. *Rep. Prog. Phys.*, 1988, vol. 51, no. 2, pp. 143-188.
41. Gilman J.J. Cohesion in ball lightning. *Appl. Phys. Lett.*, 2003, vol. 83, no. 11, pp. 2283-2284.
42. Сент-Дьёрдьи А., *Биоэлектроника. Исследование в области клеточной регуляции, защитных механизмов и рака*. М.: Мир, 1971, 80 с. [Szent-Gyorgyi A. *Bioelectronics. A study in cellular regulations, defense, and canser*. N.-Y.: L. Academic Press Inc., 1968. (In Russ.)]

43. Сент-Дьердьи А. *Введение в субмолекулярную биологию*. М.: Наука, 1964, 164 с. [Szent-Gyorgyi A. *Introduction to a molecular biology*. N.-Y.-L.: Academic Press Inc., 1964. (In Russ.)]
44. Авакян Р.С., Габриэлян Г.Г., Мадосян Л.В., Меликян Р.Л., Таубе А.Л., Тевосян А.Л. Устройство «Арцах» для микроволновой резонансной терапии. *Электронная промышленность*, 1990, № 12, с. 30-31. [Avakyan R.S., Gabrielyan G.G., Madosyan L.V., Melikyan R.L., Taube A.L., Tevosyan A.L. Device "Arctchah" for microwave resonance therapy. *Electronic industry*, 1990, no. 12, pp. 30-31. (In Russ.)]
45. Aaron R.K., McK. Ciombor D., Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair. *J. Cell Biochem.*, 1993, vol. 52, no. 1, pp. 42-46.
46. Григорьев Ю.Г. Роль модуляции в биологическом действии электромагнитных излучений. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 1996, т. 35, № 5, с. 659-670. [Grigoriev Yu.G. The role of modulation in biology effect of electromagnetic radiation. *Radiation biology. Radioecology*, 1996, vol. 35, no. 5, pp. 659-670. (In Russ.)]
47. Девятков Н.Д., Плетнёв С.Д., Бецкий О.В., Файкин В.В. *Воздействие низкоэнергетического импульсного СВЧ-излучения наносекундной длительности с большой пиковой мощностью различной длины волны на ионный транспорт, проницаемость клеточных мембран, процессы агрегации клеток и развития злокачественных образований*. Сб. докл. 12-го Росс. симп. «Миллиметровые волны в медицине и биологии». М.: ИРЭ РАН 2000. [Devyatkov N.D., Pletnev S.D., Betsky O.V., Faikin V.V. *The impact of low-energy pulsed microwave radiation of nanosecond duration with a large peak power of various wavelengths on ion transport, the permeability of cell membranes, cell aggregation and the development of malignant tumors*. Collection of reports of the 12th Russian Symposium. "Millimeter waves in medicine and biology". Moscow. IRE RAS. 2000. (In Russ.)]
48. Smirnov I. *The effect of low intensity electromagnetic fields on water molecular structure and its medical applications*. Тез. Докл. Третьей межд. конф. «Физика – наукам о жизни», СПб., ФТИ, 2019, с. 113. [Smirnov I. *Book of Abst. of Third Int. confer. "Physics – to sciences about life"*, SPb., Ioffe Inst., 2019, p. 113. (In Russ.)]
49. Space the new frontier in the battle against cancer. ABC News, 2019, vol. 27.
50. *Механизмы клеточной гравичувствительности*, под ред. Л.Б. Буравковой. М.: ГИЦ РФ-ИМБП РАН. 2018, 244 с. [The mechanisms of the cellular gravisensitivity. Ed. by L.B. Buravkova). M.: GNTCH RF IMBP RAS. 2018, 244 p. (In Russ.)]
51. Makeev V.M. Стохастический резонанс и его возможная роль в живой природе. *Биофизика*, 1993, т. 38, № 16, с. 194-201. [Makeev V.M. Stochastic resonance and its possible role at live nature. *Biophysics*, 1993, vol. 38, no. 1, pp. 194-201. (In Russ.)]
52. Бинги В.Н. *Принципы электромагнитной биофизики*. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011, 592 с. [Binhi V.N. The principles of electromagnetic biophysics. M.: Fizmatlit, 2011, 592 p. (In Russ.)]

MICROWAVE RADIATIONS IN ONCOLOGY: ABOUT POSSIBILITY OF INHIBITION OF MALIGNANT MITOSIS

Avakyan S.V.¹, Baranova L.A.²

¹ All-Russian Scientific Center "S.I. Vavilov State Optical Institute "

Birjevaia lane, 10, Saint-Petersburg, 199034, Russia

² Ioffe Institute

Politechnicheskaya st., 26, Saint Petersburg, 194021, Russia; e-mail: l.baranova@mail.ioffe.ru

Abstract. Known experimental results on the influence of two factors on the mitosis of cancer cells are considered: - artificially created weightlessness; - the flow of microwave radiation from the Earth's ionosphere. An interpretation of these results in the framework of supramolecular physics is presented. The generation of supramolecular structures (water-containing associates) in a living organism is considered taking into account: - proton transfer in the hydrogen bonding act due to the high degree of proton affinity for water molecules; - absorption of a quantum of microwaves by an electron on the Rydberg orbital, excited to this state upon its' capture during neutralization of a charge introduced by a proton, which ensures an increase in the yield of stable water-containing associates; - generation of induced microwave radiation in the media of a living organism, forming a directed biological field in it; - formation, in the processes of collisions with water-containing associates, highly excited Rydberg molecules of biomaterials in living media. The proposals on the medical application of irradiation of tumors by a flow of microwaves with spatiotemporal modulation at an environmentally friendly nature-like level were discussed with a view to the possible inhibition of malignant cell division taking into account proton transfer, the appearance of Rydberg molecules in the biological media and the appearance of directed biological field due to induced emission.

Key words: associate formation in biological solutions, microwave irradiation from the ionosphere, induced and spontaneous radiations.

О РОЛИ ЭРИТРОЦИТОВ В ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИИ ЖЕЛЕЗА В ТКАНЯХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ РАСПРОСТРАНЕННЫХ СТАДИЙ

Бакурова Е.М.¹, Дорошкевич В.С.², Добаева Н.М.³, Турсунова Ю.Д.¹

¹ ГОО ВПО «ДонНМУ им. М. Горького»

пр. Ильича, 16, г. Донецк, 283003; e-mail: 32023@mail.ru

² ГОУ ВПО «ДонНУ»

пр. Гурова, 14, г. Донецк, 283001

³ ФГОУ ВПО РостГМУ

пер. Нахичеванский, 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, РФ

Поступила в редакцию: 29.07.20

Аннотация. В эритроцитах больных раком желудка, раком кишечника распространенных стадий исследованы уровни металлов переходной группы, особенности активности ферментов антиоксидантной системы. Определение содержания металлов в эритроцитах проводили с учетом особенностей их циркуляции в кровотоке. Установлено, что эритроциты крови, оттекающей от пораженного органа, содержат меньшее количество железа, чем эритроциты этого же пациента, циркулирующие в системном кровотоке. Перераспределению железа эритроцитов сопутствовало повышение активности их супероксиддисмутазы и снижение активности глутатионпероксидазы. При сопоставлении содержания металлов в гомогенатах опухолей с их уровнями в нетрансформированных смежных тканях установили, что для железа и меди было характерным их более высокое содержание в опухоли. Установлена обратная связь между повышением содержания железа в опухоли и снижением его содержания в эритроцитах крови, оттекающей от пораженного органа (показатель корреляции Спирмена $\rho = -0,72$, т.е. отрицательная связь). Для остальных металлов такой связи не выявлено. Следовательно, эритроциты могут стать источником железа для тканей опухоли, что может способствовать формированию ее агрессивного фенотипа.

Ключевые слова: железо, медь, кобальт, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, рак, эритроциты.

Одним из проявлений системного характера влияния опухоли на организм и ее агрессии является анемический синдром. Его развитие сопряжено с ухудшением прогноза выживаемости пациента [1]. Следовательно, является актуальным выявление патогенетических особенностей развития синдрома анемии у онкологических больных для его профилактики. Ранее нами были установлены нарушения метаболизма эритроцитов у больных раком распространенных стадий [2]. Они свидетельствуют о преимущественно гликолитическом потреблении глюкозы, напряженности энергообмена и газотранспорта. Предполагаем, что дисметаболические процессы в эритроцитах еще до развития анемии могут быть фактором развития гемической гипоксии. В свою очередь гипоксия способствует формированию агрессивного фенотипа опухоли.

Известно, что некоторые активные формы кислорода (АФК) являются универсальными сигнальными молекулами. В опухолях различных локализаций они запускают ангиогенез, миграцию клеток и их инвазию, т.е. непосредственно участвуют в формировании агрессивных черт неоплазмы [3]. В организме ионы металлов переменной валентности хелатированы, т.к. в свободном состоянии инициируют реакции свободнорадикального окисления, ответственны за продукцию АФК, т.ч. самого мощного разрушителя - гидроксильного радикала [4]. Ряд опухолей характеризуется повышенным содержанием некоторых металлов. Поскольку в эритроцитах сосредоточено до 70% железа, содержащегося в организме, нами предпринята попытка параллельного определения содержания некоторых металлов переходной группы как в тканях опухолей, так и в эритроцитах крови с учетом их циркуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено сравнительное исследование активности ферментов в 53 образцах гемолизатов отмытых эритроцитов. При выделении из цельной крови эритроциты крови трижды отмывали физиологическим раствором, центрифугируя при 1200g. Активность антиоксидантных ферментов определяли спектрофотометрически [2]. Активность супероксиддисмутазы регистрировали по подавлению окисления адреналина при pH 10,2. При расчете единиц активности учитывали 50% подавление автоокисления адреналина. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя окрашенные в желтый цвет его производные соединения с 2-нитро-5-тиобензойатом. Содержание металлов изучали методом атомно-эмиссионной спектроскопии (спектрометр атомно-эмиссионный СЭВ-30). Уровни железа, меди, кобальта и цинка определяли в эритроцитах и гомогенатах тканей распространенного рака (T₃₋₄N_{1-х}M_{0-х} стадий), а также нетрансформированной слизистой края резекции органа. При определении содержания металлов в эритроцитах учитывали их локальность в системном кровотоке. Для этого получали

Таблица 1. Содержание металлов в тканях распространенного рака желудка и кишечника, мкг/г (медиана, первый и третий квартили)

Fe		Cu		Co		Zn	
К-ль	О	К-ль	О	К-ль	О	К-ль	О
43,5	65,5**	9,4	15,3	60,0	24,9	5,0	3,6
(26,0;	(49,0;	(3,5;	(8,3;	(25,0;	(6,0;	(1,1;	(0,5;
97,5)	152,0)	39,4)	49,8)	110,0)	32,0)	8,4)	5,0)

Примечание. К-ль – нетрансформированная слизистая края резекции (контроль); О – опухоль;

* - $p < 0,01$ в опухоли по сравнению с контролем.

образцы крови, взятой во время операции из локтевой вены, а также из вены, выносящей кровь от оперируемого отдела желудка или кишечника. Получение гомогенатов тканей проводили по стандартной методике, используя 0,25 М раствор сахарозы в 0,005 М трис-НCl-буфере pH 8,1 и 0,15 М KCl. Для определения содержания металлов использовали по 10 пар образцов тканей (опухоль-нетрансформированная слизистая). Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью лицензионных программ «MedStat» (Альфа). Для проверки распределения на нормальность использовался критерий W Шапиро-Уилка, что позволяет корректно проводить проверку при небольших объемах выборки. При анализе данных для оценки генеральной совокупности использовались стандартные характеристики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание железа в гомогенатах карцином желудка и кишечника было наивысшим по сравнению с металлами-микроэлементами. В опухолях – от 150 мкг/г до 50 мкг/г, в нетрансформированных тканях – от 98 до 26 мкг/г (табл. 1).

При сравнении образцов тканей в каждом отдельном случае (опухоль/нетрансформированная ткань края резекции) – уровни железа в опухолях были выше, чем в тканях в 1,3-1,6 раза ($p = 0,03$).

В отличие от цинка и кобальта содержание меди в опухоли также было выше по сравнению со слизистой края резекции (в 1,6-2,4 раза, $p < 0,05$). Повышение содержания железа и меди в карциномах желудка и кишечника способствует формированию в них токсичных форм АФК. Например, в реакциях Хабера-Вейса, Фентона генерируется радикал гидроксила ($\text{HO}\cdot$). Он стимулирует ангиогенез [3]. Обладая мощным повреждающим действием на ДНК, РНК, способствует гибели перитуморальных клеток, опосредует инвазию опухолевого клона.

При определении непараметрического коэффициента ранговой корреляции лишь между уровнями железа и меди в тканях карцином выявлена прямая сильная связь (коэффициент Спирмена $\rho = 0,83$, $p < 0,05$). Данная взаимосвязь указывает на некоторую синергию между металлами переменной валентности, т.к. одновременное повышение их уровней будет усиливать прооксидантные процессы. Для остальных металлов, как в контрольных тканях, так и в опухолевых, корреляции не выявлено.

В данном исследовании нас интересовал вопрос о возможных причинах перераспределения содержания некоторых металлов в опухолях. Параллельно с тканями мы провели исследование уровней этих же металлов в эритроцитах крови. При этом эритроциты выделяли из крови, забранной из локтевой вены (э.в) и из вены, выносящей кровь от оперируемого органа (э.о).

Содержание железа в эритроцитах периферической крови значительно варьировало от 6340 до 1862 мкг/г. В эритроцитах крови, оттекающей от органа – от 5397 до 1023 мкг/г (табл. 2).

В каждом индивидуальном случае в эритроцитах крови, оттекающей от органа, содержание железа было всегда ниже его уровней в эритроцитах в системном кровотоке. По сравнению с остальными металлами эти различия были характерны лишь для железа ($p = 0,005$). Установлена обратная связь между повышением содержания железа в опухоли и снижением его содержания в эритроцитах крови, оттекающей от пораженного

Таблица 2. Содержание металлов в эритроцитах при распространенных формах рака желудка и кишечника, мкг/г (медиана, первый и третий квартили)

Fe		Cu		Co		Zn	
Э.в	Э.о	Э.в	Э.о	Э.в	Э.о	Э.в	Э.о
2844,5	2327,5*	10,6	12,3	137,0	124,7	2,7	2,8
(2272,0;	(1281,00;	(7,3;	(4,3;	(65,0;	(51,0;	(1,4;	(1,9;
4820,0)	3390,0)	14,7)	15,4)	158,0)	272,0)	4,0)	5,2)

Примечание. Э.в – эритроциты периферической крови (контроль); э.о – эритроциты крови, оттекающей от органа; * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Таблица 3. Особенности активности ГПО в эритроцитах при распространенных формах рака желудка и кишечника, мкмоль/мин · мг

	Контроль (n = 19)	РЖ (n = 18)		КРР (n = 16)	
Группа		I	II	I	II
ГПО	6,67 ± 1,75	5,31 ± 0,87	1,10 ± 0,29*	4,15 ± 1,65	0,99 ± 0,69*

Примечание. * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

органа (коэффициент Спирмена $\rho = -0,66$ т.е. отрицательная связь). Для остальных металлов такой связи не выявлено. Следовательно, эритроциты – наиболее вероятные доноры железа для тканей опухоли, что может способствовать формированию ее агрессивного фенотипа.

Как было отмечено нами ранее, нарушения метаболизма эритроцитов могут стать причиной их структурно-функциональных изменений, обуславливающих их более раннюю элиминацию из кровотока или внутрисосудистый гемолиз. Ключевыми факторами в патогенезе синдрома «старения эритроцитов» считают процессы свободнорадикального окисления, карбонилирования и нитрозилирования гемоглобина (Hb). В них участвует железо гема, а Hb переходит из растворимого в мембраносвязанное состояние (МСНб). Нарастание уровней нефункционального МСНб ускоряет гемолиз [5].

При изучении активности супероксидсмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО) в эритроцитах периферической крови установили преимущественное нарастание активности СОД по сравнению с контролем. Вероятно, что в этих случаях в эритроцитах мог формироваться супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$). Супероксиданион способен инициировать восстановительное высвобождение ионов металлов переменной валентности, в особенности железа, из их комплексов с биологическими молекулами [4]. В системе эритроцита – это глобиновые цепи Hb. К тому же, протонированная форма этого радикала гидрофобна. Аккумулируясь в мембране, запускает цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) [4]. Следствием их усиления будет сокращение периода активной системной циркуляции эритроцита, или внутрисосудистый гемолиз.

По результатам кластерного анализа группа больных по активности эритроцитарной ГПО оказалась неоднородной (табл. 3). Статистический анализ выделил 2 кластера (I и II группа). В одном кластере активность фермента достоверно не отличалась от контроля (I группа). В другом кластере она была снижена (II группа). Вероятно, что в этих случаях в эритроцитах мог формироваться пероксид водорода (H_2O_2). В результате корреляционного анализа установлена обратная отрицательная связь между активностями СОД и ГПО в эритроцитах (коэффициент Спирмена $\rho = -0,65$).

Известно, что удельная активность ГПО зависит от содержания в клетке восстановленного глутатиона. Низкая активность фермента может быть обусловлена снижением его уровней. Восстановленный глутатион, помимо детоксикации H_2O_2 , играет ключевую роль в инактивации органических гидропероксидов, а также дикарбониллов и токсичных для клетки конечных продуктов гликирования [6, 7]. Следовательно, можно предположить снижение устойчивости не только к оксидативному, но и к карбонильному, гликативному стрессам эритроцитов, вошедших по результатам статистического анализа во второй кластер.

Следовательно, дисбаланс активностей СОД и ГПО в эритроцитах, сформировавших II группу, может способствовать усилению прооксидантных процессов, в частности, формированию условий для протекания реакции Фентона [4]. В ходе ее неферментативное взаимодействие пероксида водорода с ионом железа приводит к образованию из H_2O_2 крайне агрессивного $HO^{\cdot}$. Следовательно, из-за интенсификации ПОЛ, окислительной модификации белков будут создаваться метаболические предпосылки к развитию синдрома «раннего старения эритроцита». Они же обусловят дегенерацию МСНб и выход липофильного гема из эритроцита, из-за его способности проникать через мембрану. Благодаря железу гем сам обладает выраженными прооксидантными эффектами. Можно предполагать, что следствием дисметаболических процессов в эритроцитах циркулирующей крови у пациентов с распространенными формами рака будет развитие их дисфункции и гемической гипоксии. Период активной циркуляции красных клеток крови будет уменьшаться. В результате сами эритроциты могут быть источником железа для опухоли за счет деградации мембраносвязанного Hb.

Таким образом, в карциномах желудка и кишечника выявлено преимущественное повышение концентраций железа по сравнению с нетрансформированными смежными тканями. В перераспределении железа в организме у онкобольных могут участвовать эритроциты. Выявленный дисбаланс активности СОД и ГПО, рассмотрен в качестве патогенетического фактора развития анемического синдрома и опухолевой агрессии.

Список литературы / References:

1. Aapro M., Osterborg A., Gascon P., Ludwig H., Beguin Y. Prevalence and management of cancer-related anaemia, iron deficiency and the specific role of i.v. iron. *Annals of Oncology*, 2012, vol. 23, pp. 1954-1962. DOI: 10.1093/annonc/mds112.
2. Бакурова Е.М. Особенности энергетического метаболизма эритроцитов у больных раком распространенных стадий. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технич. конференции*, г. Севастополь, 25-29 апреля 2016 г.: в 2 т. Т. 2. Севастополь:

- Севастопольский государственный университет, 2016, 226 с. [Bakurova E.M. The Energy Metabolism of Red Blood Cells Features in Patients with Advanced Tumors. *Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2016: Proceedings of XI International Science-Technical Conference*, Sevastopol, 25-29 of April, 2016, vol. 2. Sevastopol: Sevastopol State University, 2016, 226 p. (In Russ.)]
3. Mistry R.K., Brewer A.C. Redox regulation of gasotransmission in the vascular system: A focus on angiogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2017, vol. 108, pp. 500-516. DOI: 0.1016/j.freeradbiomed.2017.04.025.
4. Шендрик А.Н., Каниболоцкая Л.В. *Радикальные реакции в клетке. Уч-метод. Пособие*. Донецк: ДонНУ, 2007, 152 с. [Shendrik A.N., Kanibolotskaya L.V. *Radikalnyie reaktsii v kletke. Uch-metod. Posobie*. Donetsk: DonNU, 2007, 152 p. (In Russ.)]
5. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress. *Hemoglobin*, 2013, vol. 37, no. 3, pp. 205-218.
6. Буко И.В., Цапаева Н.Л. Диагностическая информативность показателей системы глутатиона эритроцитов, окислительного стресса и воспаления при ишемической болезни сердца. «*Лабораторная диагностика. Восточная Европа*», 2019, т. 8, № 2, с. 227-236. [Buko I., Tsapaeva N. Diagnostic Informational Content of the Indices of Erythrocyte Glutathione System, Oxidative Stress and Inflammation in Ischemic Heart Disease. "Laboratory Diagnostics. Eastern Europe", 2019, vol. 8, no. 2, pp. 227-236. (In Russ.)]
7. Lin J.A., Wu C.H., Lu C.C. et al. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression. *Mol Nutr Food Res*, 2016, vol. 60, no. 8, pp. 1850-1864. DOI: 10.1002/mnfr.201500759.

THE ROLE OF ERYTHROCYTES IN THE REDISTRIBUTION OF IRON IN ADVANCED TUMORS OF GASTRIC OR COLON CANCER

Bakurova E.M.¹, Doroshkevich V.S.², Dobaeva N.M.³, Tursunova Yu.D.¹

¹ Maksim Gorky National Medical University
pr. Il'icha, 16, Donetsk, 283003, e-mail: 32023@mail.ru

² Donetsk National University
Gurova Ave., 14, Donetsk, 283001,

³ Rostov State Medical University
Nakhichevsky per., 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Abstract. A comparative study of antioxidant system enzymes activity and the levels of transition group metals in erythrocytes and tumor tissues of advanced gastric or colon cancer was carried out. Determination of metal content in erythrocytes was carried out according to peculiarities of their bloodstream circulation. It was found that erythrocytes of blood flowing from the affected organ contain less iron than erythrocytes of the same patient circulating in the systemic blood flow. The redistribution of iron in erythrocytes was accompanied by an increase in the activity of their superoxide dismutase and a decrease in the glutathione peroxidase activity. When comparing the metal content in tumor homogenates with their levels in nontransformed adjacent tissues, it was found that iron and copper were characterized by their higher content in tumors. Feedback between the increase of iron content in tumor and decrease of its content in erythrocytes of blood flowing from the affected organ was established (Spirman correlation index $\rho = -0.66$, i.e. negative correlation). For other metals this pattern has not been revealed. Therefore, erythrocytes may become a source of iron for tumor tissues, which may contribute to the formation of their aggressive phenotype.

Key words: iron, copper, cobalt, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, cancer, erythrocytes.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НА ТЕЧЕНИЕ COVID-19**Генералов Е.А.¹, Генералова Л.В.²**¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: generals1179@gmail.com² ООО НПФ «Гемма-Б»
ул. Василия Петушкова, 20, стр. 1, г. Москва, 125476, РФ; e-mail: lira.vialbe@rambler.ru

Поступила в редакцию: 31.07.20

Аннотация. В работе представлены основные результаты клинического применения препарата «Иммеран» в клинической практике у больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19, сочетанной с язвенной болезнью желудка или двенадцатиперстной кишки. Пациенты амбулаторно получали антикоагулянты, антибактериальную, противовязвенную и противовирусную терапии. По результатам объективного обследования и клинической картины производилась постановка диагноза, соответствующего U07.1 - новая коронавирусная инфекция COVID-19. Результаты позволяют отметить положительную динамику по компьютерной томографии органов грудной клетки (КТ ОГК) - уменьшение процента поражения паренхимы лёгких и быструю нормализацию температуры тела пациентов - в течение 2-3 суток от начала применения препарата «Иммеран». Вместе с тем применение препарата «Иммеран» переносилось хорошо, нежелательных побочных явлений не отмечалось.

Ключевые слова: «Иммеран», полисахарид, SARS-CoV-2, COVID-19, КТ, пневмония.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из острых проблем современности является новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная (+)оцРНК вирусом SARS-CoV-2. В настоящее время до сих пор не существует эффективной терапии этого инфекционного заболевания, а существующие меры либо имеют ярко выраженные отрицательные побочные эффекты, либо недостаточно эффективны и не для всех социальных групп могут быть использованы.

Последние исследования эффективности препаратов «Арбидол», «Лопинавир» / «Ритонавир» [1] и «Гидроксихлорохин» [2], показали их недостаточную эффективность и наличие побочных эффектов, не позволяющих применять у некоторых групп пациентов. Вместе с тем до сих пор недостаточно данных, подтверждающих эффективность препаратов «Фавипиравир» и «Актема» [3].

Цитокины являются неотъемлемыми участниками иммунных реакций – опосредуют передачу межклеточных и внутриклеточных сигналов, являясь одним из основных регуляторов воспалительных реакций. Выработка цитокинов осуществляется в основном активированными лимфоцитарными, моноцитарными и макрофагальными клетками, что приводит к развитию воспаления, миграции клеток предшественников или, чаще, образованию рубца на месте язвенного дефекта. Применение препарата «Иммеран» приводит к заживлению язвенного дефекта нормальной функциональной тканью. Учитывая отсутствие прямого действия препарата на клетки предшественники эпителия кишечника или желудка и подтверждённое регуляторное действие препарата на концентрацию цитокинов [4, 5], а также критическую ситуацию с отсутствием эффективных препаратов для регенерации лёгочной ткани, то было предложено использовать «Иммеран» для восстановления паренхимы лёгких у больных COVID-19.

Отсутствие побочных реакций *in vivo* [4], которые наблюдаются при парентеральном введении TNF, LPS может быть и связано с показанной нами способностью препарата подавлять высокую продукцию IL-1 [5], что проявляется в снижении воспалительно-дистрофических явлений [6]. Способность увеличивать продукцию противовоспалительного IL-4 и провоспалительного IL-6 (стимуляция продукции цитокина происходит одновременно с повышением продукции циркулирующих антагонистов) при инфекционном поражении может, в свою очередь, приводить к стимуляции синтеза белков острой фазы, например, α-1-кислого гликопротеина [7, 8]. Последний обладает модулирующими действиями на функции лимфоцитов периферической крови и секрецию цитокинов человеческими моноцитами и альвеолярными макрофагами.

Детальный анализ изменений субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов с коронавирусом [9] указывает на то, что эти свойства препарата могут быть незаменимыми при профилактике и лечении на первой стадии больных с коронавирусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат «Иммеран» зарегистрирован как лекарственный препарат для лечения язвы желудка и двенадцатиперстной кишки (РУ № ЛП-004128 от 08 февраля 2017 года). Представляет собой полисахарид с молекулярной массой 70 кДа, моносахаридный состав которого в основном представлен арабинозой, глюкозой и галактозой. При этом регенераторный эффект у пациентов с язвенным дефектом наблюдался параллельно с регулированием уровней про- и противовоспалительных цитокинов, например: IL-1, IL-4, IL-6, TNF, что

позволило предположить эффективность этого препарата при коронавирусной инфекции в качестве средства для восстановления паренхимы лёгких.

Основываясь на содержании раздела 5.1 Временных методических рекомендаций, о возможности применения препаратов «off-label» для терапии инфекционного заболевания COVID-19, наличие язвенного дефекта и первичных положительных результатах после первых инъекций - пациенты принимали препарат «Иммеран» параллельно со стандартной терапией в соответствии с документом министерства здравоохранения «Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Версия 5: Арбидол, Гидроксихлорохин, Азитромицин, Левофлоксацин, Эноксапарин, Аскорбиновая кислота (или аналоги). Для терапии язвенной болезни использовался препарат «Иммеран» в комбинации с ингибитором протонной помпы - препаратом Омепразол. При этом у всех пациентов имелся подтверждённый диагноз COVID-19 на основании ПЦР анализа мазка из носоглотки (U07.1), и/или IgA, IgG, IgM к SARS-CoV-2, и/или характерной картины КТ лёгких (U07.2).

Измерения температуры тела проводились дважды в день – утреннее и вечернее время.

КТ исследование у пациентов проводилось на 2-4 день от появления первых признаков заболевания - озноба, одышки, слабости и/или повышения температуры тела. У двоих пациентов единственным первичным симптомом заболевания являлось потеря обоняния. На КТ-снимках у всех пациентов обнаруживались картина двусторонней полисегментарной пневмонии с зонами консолидации лёгочной ткани с уплотнением по типу «матового стекла». Второе КТ исследование выполнялось на том же приборе и тем же специалистом, что и при первом исследовании через 7 (группа 1 – пациенты 6-10) или 14 (группа 2 – пациенты 1-5) дней.

Так же производился забор материалов – мазок из носоглотки, для проведения ПЦР исследования на РНК SARS-CoV-2 троекратно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст пациентов составил в группе 1 – 65,8, в группе 2 – 66,8 лет. Из сопутствующих заболеваний в 70% случаев имелось предожирение или ожирение, в 60% случаев – гипертоническая болезнь.

В результате были получены следующие данные. На рисунке 1 представлена диаграмма, отображающая динамику изменения процента поражения паренхимы легких у больных COVID-19 до и после терапии препаратом «Иммеран». В группе 1, пациенты, получавшие препарат «Иммеран» в течение 14 дней, уменьшение процента поражения легочной ткани составило в среднем 24 %. В группе 2 – 22%.

Температурные карты пациентов 1 и 2 групп представлены на рисунках 2 и 3. В обеих группах наблюдается чёткая динамика к нормализации температуры после первых двух внутривенных инъекций препарата «Иммеран».

Следует отметить, что ПЦР показал наличие патогена у 8 из 10 пациентов (кроме 5 и 9), при этом к концу лечения в обеих группах ПЦР не определял наличие РНК вируса на слизистой носоглотки пациентов, что может свидетельствовать о его элиминации.

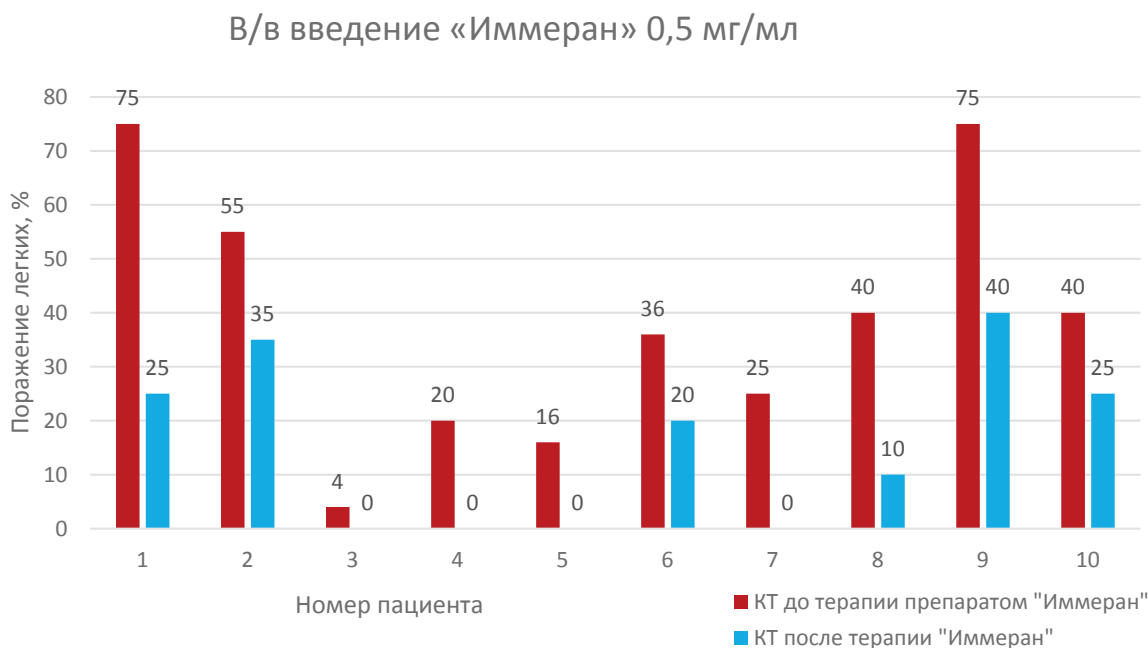


Рисунок 1. КТ данные терапии пациентов с COVID-19 с применением препарата «Иммеран»

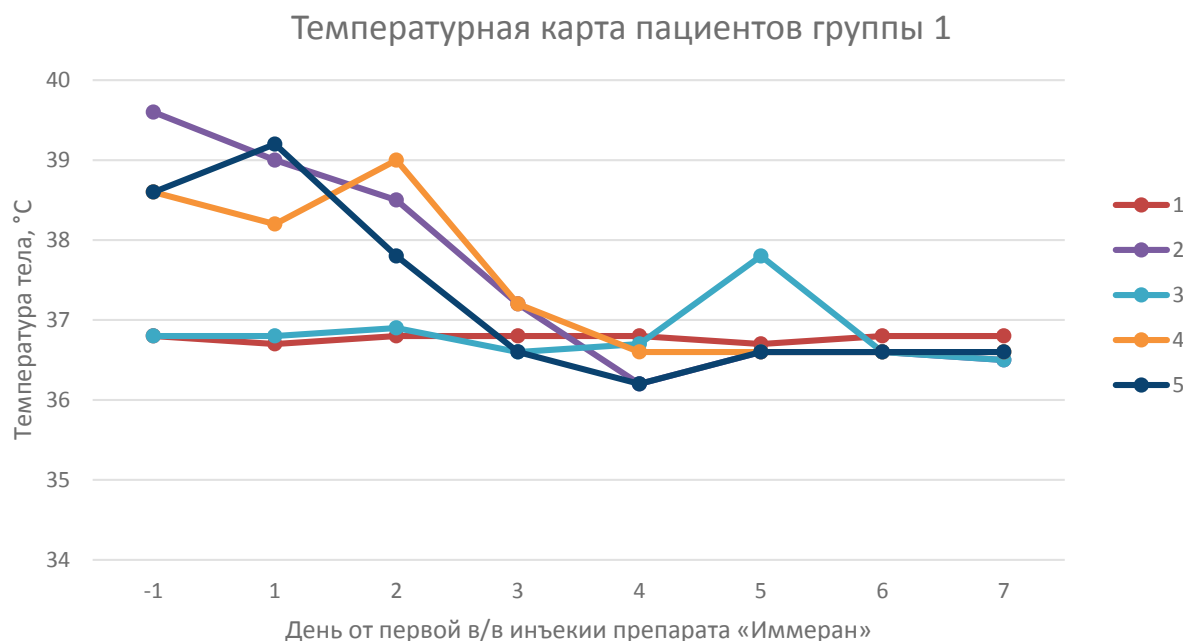


Рисунок 2. Температурные карты пациентов группы 1

В ходе исследования применение препарата «Иммеран» не были выявлены отрицательные или нежелательные побочные явления и переносилось пациентами хорошо.

Учитывая быструю нормализацию температуры, то можно предположить, что применение препарата «Иммеран» ни у одного из пациентов не вызвало и даже снижало вероятность возникновения «цитокинового шторма» или какого-либо другого ответа, соответствующего гиперактивации иммунной системы. Ни одного летального исхода не наблюдалось.

В ходе исследования были получены данные о стимуляции регенерационных процессов и нормализации температуры тела препаратом «Иммеран». По всей видимости такая активность связана с нормализацией уровней про- и противовоспалительных цитокинов в организме пациентов, поражённых SARS-CoV-2. В свою очередь изначально повышенные концентрации IL-6 стимулируют миграцию клеток-предшественников к месту повреждения паренхимы лёгких, а дальнейшее повышения уровня IL-4 после применения «Иммеран» приводит к нормализации температуры и уменьшению воспалительных явлений. Вместе с тем клетки-предшественники, мигрируя к очагу воспаления, дифференцируются согласно клеточного окружения и не дают сформироваться фиброзным очагам и тяжам.

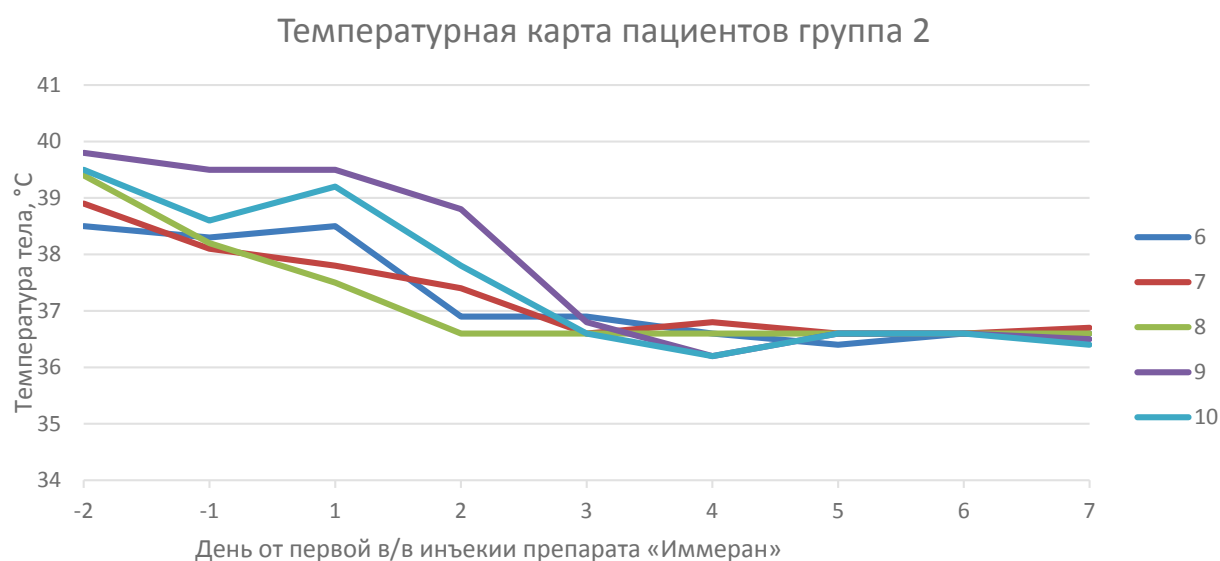


Рисунок 3. Температурные карты пациентов группы 2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют сделать предположение об эффективности применения препарата «Иммеран» у больных коронавирусной инфекции для быстрой стабилизации клинической картины и восстановления паренхимы лёгких. Однако для подтверждения возможности применения «Иммеран» в клинической практике у пациентов с инфекционными заболеваниями требуются расширенные клинические испытания, включающие в себя лабораторную диагностику.

Список литературы/References:

1. Yueping Li, Zhiwei Xie et al. An exploratory randomized controlled study on the efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol treating adult patients hospitalized with mild/moderate COVID-19 (ELACOI). April 15, 2020. *medRxiv* 2020.03.19.20038984. DOI: 10.1101/2020.03.19.20038984.
2. Magagnoli J., Narendran S. et al. Outcomes of hydroxychloroquine usage in United States veterans hospitalized with Covid-19. *medRxiv* preprint. DOI: 10.1101/2020.04.16.20065920. this version posted April 21, 2020.
3. Liu S., Lien C.Z., Selvaraj P., Wang T.T. Evaluation of 19 antiviral drugs against SARS-CoV-2 Infection. *bioRxiv* 2020.04.29.067983. DOI: 10.1101/2020.04.29.067983.
4. Резюме по доклиническому изучению лекарственного средства «Иммеран, раствор для внутривенного введения 0,5 мг/мл» [Rezyume po doklinicheskomu izucheniyu lekarstvennogo sredstva «Immeran, rastvor dlya vnutrivennogo vvedeniya 0,5 mg/ml»] (In Russ.)
5. Генералов Е.А. Влияние полисахаридного препарата «Иммеран» на течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019*. [Generalov E.A. Vliyanie polisaharidnogo preparata «Immeran» na techenie yazvennoj bolezni zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH-2019*. (In Russ.)]
6. Щербakov П.Л., Буриан Э.Ф., Вихрова Т.В. и др. Новые медицинские технологии в терапии язвенной болезни. *Лечение и профилактика*, 2011, вып. 1, с. 22-25. [Shcherbakov P.L., Burian E.F., Vihrova T.V. i dr. Novye medicinskie tekhnologii v terapii yazvennoj bolezni. *Lechenie i profilaktika*, 2011, vol. 1, pp. 22-25. (In Russ.)]
7. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2014, vol. 6 (10), p. a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
8. Luo Z., Lei H., Sun Y. et al. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. *J. Physiol Biochem.*, 2015, vol. 71 (2), pp. 329-40. DOI: 10.1007/s13105-015-0389-9.
9. Wang F. et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020. DOI: 10.1093/infdis/jiaa150.

INFLUENCE OF POLYSACCHARIDES ON COVID-19

Generalov E.A.¹, Generalova L.V.²

¹ Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; e-mail: generals1179@gmail.com

² LLC SPC "Gemma-B"

Vasily Petushkova st., 20/1, Moscow, 125476, Russia; e-mail: lira.vialbe@rambler.ru

Abstract. The paper presents the main results of the clinical use of the drug "Immeran" in clinical practice in patients with the new coronavirus infection COVID-19, combined with gastric ulcer or duodenal ulcer. The patients received anticoagulants, antibacterial, antiulcer and antiviral therapy on an outpatient basis. Based on the results of an objective examination and a clinics, a diagnosis was made that corresponds to U07.1 - a new coronavirus infection COVID-19. The results allow us to note a positive trend in computed tomography of the chest organs (CT CO) – a decrease in the lung parenchyma percentage of damage and a rapid normalization of the patient's body temperature – within 2-3 days from the start of the drug "Immeran" injections. At the same time, the use of the drug "Immeran" was well tolerated, no undesirable side effects were observed.

Key words: "Immeran", polysaccharide, SARS-CoV-2, COVID-19, CT, pneumonia.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛЕНОЧНОЙ ДОЗИМЕТРИИ И МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЛУБИННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОГЛОЩЕННОЙ ДОЗЫ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ КЛЕТОК МЫШИ НИЗКИМИ ДОЗАМИ ПРОТОНОВ НА ЦИКЛОТРОНЕ У-150

Смирнова О.Д., Лукьяшин В.Е., Сёмочкина Ю.П., Латушкин С.Т., Родина А.В., Москалёва Е.Ю.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
пл. Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ; e-mail: smirnova0ksana@yandex.ru

Поступила в редакцию: 14.08.20

Аннотация. Изучена чувствительность культивируемых мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК), полученных из костного мозга мыши, к облучению протонами с энергией 32 МэВ и относительная биологическая эффективность (ОБЭ) протонов в диапазоне низких доз. Выживаемость МСК после облучения оценивали по изменению количества клеток и их клоногенной активности. Дозиметрию протонного излучения проводили с использованием радиохромной пленки ЕВТЗ, которую подвергали облучению в тех же условиях, что и облучаемые клетки. Для этого образцы пленки размещали в аналогичных цилиндрических пробирках в культуральной среде, моделируя условия облучения суспензии клеток. Распределение энерговыведения протонов при прохождении пучка частиц через исследуемые образцы рассчитывали с использованием программы SRIM-2013-Pro. Показано, что как общее количество МСК, так и количество МСК, способных к пролиферации, снижается с увеличением дозы облучения протонами. При этом клетки, обладающие клоногенной активностью, более чувствительны к инактивации протонами, чем общая популяция облученных МСК. При сравнении чувствительности клоногенной активности МСК к облучению протонами и гамма-квантами, показано, что клетки в диапазоне низких доз (от 0,15 до 0,6 Гр) более чувствительны к действию протонов. При расчете ОБЭ протонов по полученным данным показано возрастание этого показателя в указанном диапазоне доз от 1,54 до 2,07.

Ключевые слова: Ускоренные частицы, протоны, линейная передача энергии, дозиметрия, дозиметрическая пленка ЕВТЗ, ОБЭ, относительная биологическая эффективность, гамма-излучение, мезенхимальные стволовые клетки, клоногенная активность.

Биологические эффекты ионизирующего излучения разных типов определяются величиной дозы и линейной передачей энергии (ЛПЭ) излучения на единицу пути частицы. Потоки фотонов и протонов принципиально различаются по своим профилям поглощения энергии: фотоны теряют энергию экспоненциально, причем более высокий уровень передачи энергии имеет место ближе к точке входа пучка. Напротив, протоны большую часть энергии при взаимодействии с тканью отдают только незадолго до полной остановки частиц в области, получившей название пика Брэгга, поскольку их средняя потеря энергии на протяжении трека обратно пропорциональна квадрату их скорости [1]. Эта особенность ускоренных протонов позволяет обеспечить при лучевой терапии поглощение основной части энергии частиц в зоне опухоли и, соответственно, обеспечивает меньшее повреждение нормальных тканей за её пределами.

Для сравнения повреждающего действия излучений разных типов используют величину относительной биологической эффективности (ОБЭ), которая определяется как отношение равноэффективных доз эталонного излучения к исследуемому. В качестве эталонного излучения при этом используется γ -излучение кобальта-60, или рентгеновское излучение с энергией 250 кэВ [2]. Сведения о величине ОБЭ протонного излучения нельзя считать однозначными. В лучевой терапии при использовании высокоэнергетического излучения принято считать, что ОБЭ протонов равна 1,1 [3]. При низкоэнергетическом излучении ОБЭ протонов изучена мало, хотя такому излучению могут подвергаться космонавты при дальних космических полетах. В настоящее время накапливаются данные, свидетельствующие о более высоких значениях ОБЭ при действии низкоэнергетического излучения протонов [4;5]. При этом важно отметить, что наиболее высокая величина ОБЭ ускоренных частиц регистрируется при низких дозах, а с увеличением дозы ОБЭ снижается.

Степень повреждения клеток при облучении, помимо дозы, зависит от вида ионизирующего излучения, особенностей облучаемых клеток и может различаться в зависимости от показателей, выбранных для оценки воздействия. Мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МСК) играют важную роль в обеспечении регенерации тканей при различных типах повреждения, в том числе при радиационном воздействии [6;7]. Гамма-облучение в высоких дозах вызывает гибель МСК [8], а при низких дозах может приводить к изменению свойств этих клеток в облученных тканях [9]. Влияние низких доз протонного излучения на МСК не изучено, хотя эти клетки играют важную роль в поддержании кроветворения в костном мозге и стимуляции процессов регенерации в различных тканях.

В связи с этим целью настоящей работы стало исследование чувствительности культивируемых МСК, выделенных из костного мозга мыши, к облучению протонами с энергией 32 МэВ, и определение ОБЭ протонов в диапазоне низких доз. Для более точной дозиметрии протонного излучения одновременно и в одинаковых условиях проводили облучение цилиндрических пробирок с суспензией клеток и с радиохромной пленкой ЕВТЗ

в равном объеме культуральной среды, которые располагали вплотную друг к другу симметрично на оси облучения в пучке протонов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование МСК. Животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. МСК выделяли из костного мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 1-2 месяца, как описано ранее [8]. Костный мозг получали из большеберцовых костей путем промывания полости фосфатно-солевым буфером, содержащим 50 ед/мл гепарина и 25 мкг/мл гентамицина с помощью иглы 18G. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 200 g. Супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота и 50 мкг/мл гентамицина и переносили в культуральные флаконы 25 см² в плотности 40000 клеток/см² на 24 часа для прикрепления к пластиковой поверхности. Через 24 часа не прикрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся клетки, которые составляли популяцию МСК, промывали 2 раза фосфатно-солевым буфером и культивировали до достижения субконфлюентного состояния в CO₂-инкубаторе, после чего пересеивали, используя раствор трипсин-ЭДТА, и использовали в экспериментах после 25-го пассажа.

Облучение клеток. Клетки в культуральной среде подвергали действию γ -излучения от источника кобальт-60 на сертифицированной установке «ГУТ-200М» (НИЦ Курчатовский институт) при комнатной температуре в дозе 0,1 Гр при мощности дозы 0,01 Гр/мин; а в дозах 1-6 Гр – при мощности дозы 0,75 Гр/мин. Облучение клеток протонами проводили в пучке изохронного циклотрона У-150 (НИЦ Курчатовский институт) с исходной кинетической энергией протонов 32 МэВ в режиме однократных импульсов длительностью по 400 мкс и токе 1-2 мкА. Образцы облучали в виде суспензии клеток в цилиндрических пробирках диаметром 5 мм при комнатной температуре.

Дозиметрия протонного излучения при облучении клеток. Для оценки доз, полученных МСК при облучении протонами, использовали дозиметрическую пленку GAFCHROMIC EBT3 («Ashland ISP Advanced Materials», США), предназначенную для анализа низких доз излучения в соответствии с рекомендациями фирмы, так как ранее показано, что результаты пленочной дозиметрии полностью совпадают с данными дозиметрии, проводимой с использованием ионизационных камер [10]. Для получения абсолютного значения доз при облучении клеток протонами получали калибровочные кривые затемнения пленок EBT3 при их γ -облучении в разных дозах на установке «ГУТ-200М» с источником кобальт-60. Сканирование всех пленок производили с использованием сканера Epson Perfection V19 не менее, чем через 24 часа после облучения. Условия сканирования: разрешение 600 dpi, все функции автокоррекции были отключены. Для анализа использовали красный канал. При анализе небольших фрагментов пленки после их облучения в пробирках с культуральной средой параллельно с облучением клеток денситометрию пленок проводили также при использовании спектрофотометра Shimadzu3600 UV-Vis-NIR («Shimadzu Corp.», Япония; Ресурсный центр оптической микроскопии и спектроскопии) при длине волны 638 нм. Глубинное распределение поглощенной дозы для протонов рассчитывали с использованием программы SRIM-2013-Pro [12] в приближении 1,5% дисперсии по энергии и углу рассеяния протонов.

Анализ клоногенной активности МСК. Выживаемость МСК после облучения оценивали по изменению клоногенной активности клеток. Для исследования клоногенной активности сразу после облучения контрольные и облученные клетки высаживали в 6-луночные культуральные платы в количестве 100 клеток/луночку для контрольных и γ -облученных МСК. При облучении протонами количество клеток увеличивали до 200 клеток/луночку для доз 0,3 и 0,4 Гр и до 400 клеток/луночку для 0,6 Гр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из доступных решений для экспериментального детектирования распределения доз при использовании протонного пучка, как отмечено выше, является дозиметрия при помощи специальных радиоохромных пленок. Такие пленки состоят из двух слоев полиэтилена, между которыми находится активный слой (маркерный краситель, стабилизаторы и другие компоненты, придающие пленке ее энергонезависимый отклик). Оптическая плотность таких пленок возрастает под воздействием ионизирующего излучения пропорционально дозе облучения в определенном дозовом диапазоне. Пленка EBT3 является наиболее чувствительной в диапазоне доз 0,2-10 Гр, что позволяет ее использовать при работе с низкими дозами. На рисунке 1 приведена дозовая зависимость изменения оптической плотности пленки EBT3 при действии γ -излучения кобальта-60.

Повышение оптической плотности пленки до 0,5 единиц регистрируется уже после облучения в дозе 0,5 Гр, что позволяет использовать пленку EBT3 для анализа действия излучения в диапазоне низких доз, начиная от 0,2 Гр. В диапазоне от 0,2 до 1 Гр зависимость оптической пленки от дозы близка к линейной. При более высоких дозах в диапазоне 2-10 Гр увеличение оптической плотности пленки также соответствовало линейной зависимости от дозы, но с меньшим углом наклона прямой. Эта калибровочная кривая была использована для определения дозы протонов при облучении клеток.

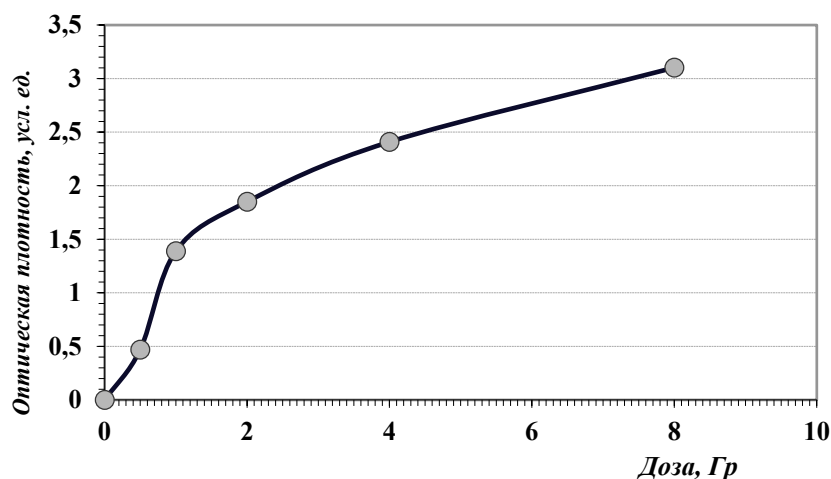


Рисунок 1. Калибровочный график для определения дозы протонного излучения по изменению оптической плотности пленки GAFCHROMIC EBT3 после γ -облучения. Денситометрия проведена на спектрофотометре Shimadzu3600 UV-Vis-NIR при 638 нм, оптическая плотность необлученной пленки вычтена

Для выбора корректного расположения образцов при одновременном облучении двух пробирок (с клетками и с радиохромной пленкой) в равных условиях предварительно анализировали равномерность пространственного распределения доз в зависимости от расстояния от оси коллимированного пучка протонов по изменению оптической плотности пленки EBT3. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Как следует из представленных на рисунке 2 данных, равные условия облучения будут достигаться при расположении каждого из объектов на расстоянии не более 6 мм от центра пучка. Эти условия были выбраны в качестве стандартных при облучении клеток и радиохромных пленок в одинаковых цилиндрических пробирках с культуральной средой, которые для облучения фиксировали в специальном стенде в центре пучка симметрично относительно его оси для обеспечения одинаковых условий облучения.

Распределение энергосвечения протонов при облучении образцов рассчитывали с использованием программы SRIM-2013-Pro для числа испытаний порядка 10^6 протонов с энергией 32 МэВ. Полученное распределение представлено на рисунке 3.

Полученные данные о распределении ЛПЭ протонов при облучении образцов суспензии клеток и радиохромных пленок в культуральной среде в цилиндрических пробирках с внутренним диаметром 5 мм свидетельствуют о том, что облучение клеток происходило с энергосвечением, характерным для начала восходящей ветви кривой Брэгга.

Полученные результаты зависимости выживаемости клеток, оцениваемой по количеству клеток и их клоногенной активности, от дозы облучения протонами представлены на рисунке 4.

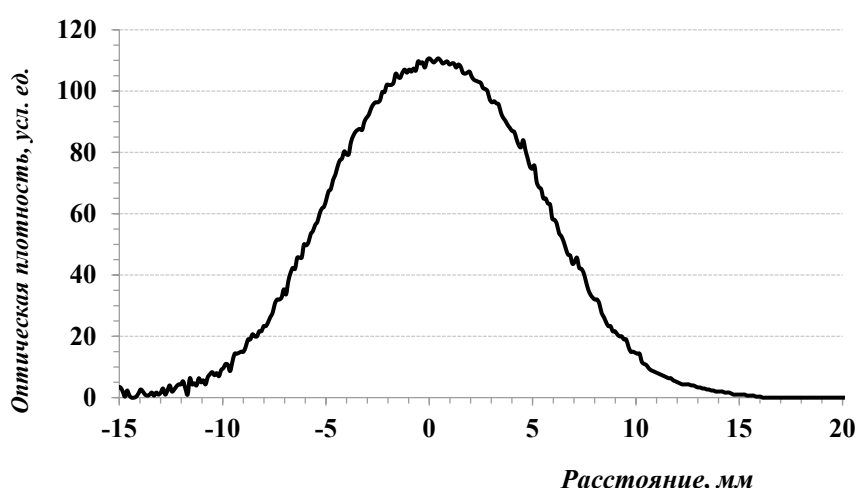


Рисунок 2. Распределение оптической плотности пленки EBT3 на оси облучения коллимированного пучка протонов в зависимости от расстояния от центра пучка

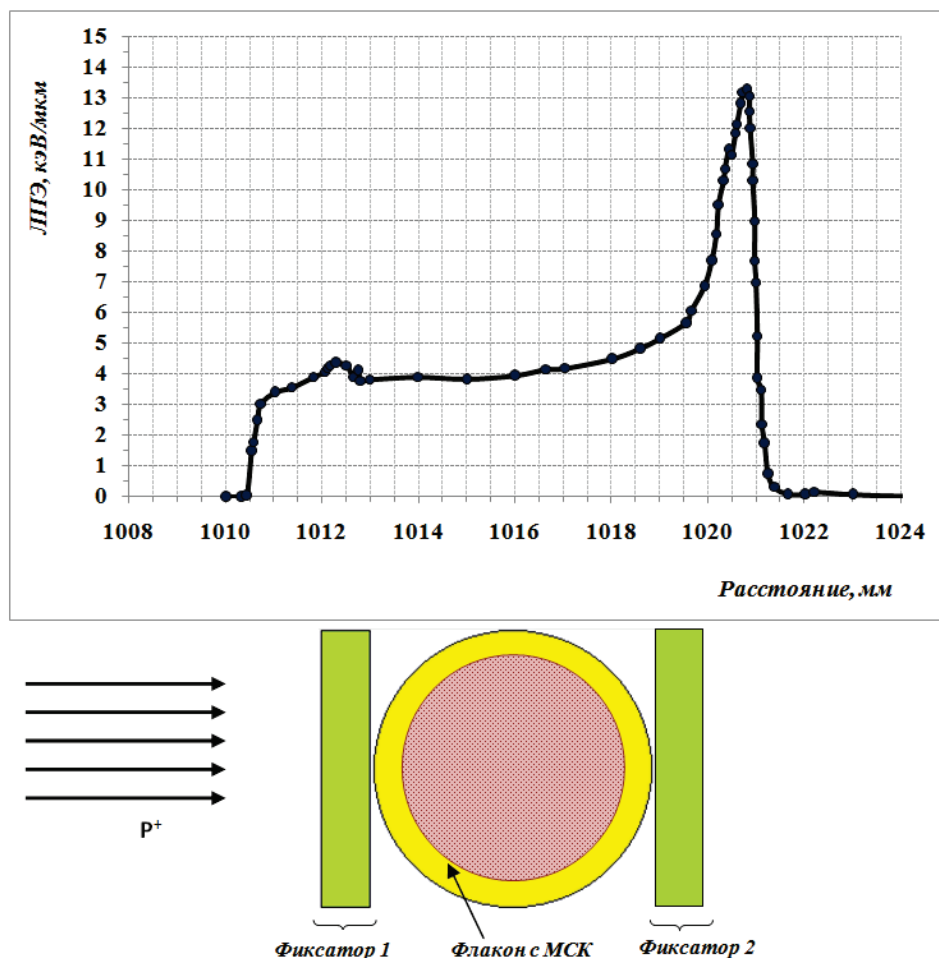


Рисунок 3. Модельный расчет ЛПЭ протонов с исходной кинетической энергией 32 МэВ на оси пучка в районе расположения облучаемых пробирок. Под графиком указано положение флакона с суспензией клеток и фиксаторов в пучке протонов p^+

Из представленных данных следует, что как общее количество МСК, так и количество МСК, способных к пролиферации, т.е. клеток, обладающих клоногенной активностью, снижается с увеличением дозы облучения протонами в выбранном диапазоне низких доз. При этом клетки, обладающие клоногенной активностью, оказались более чувствительны к инактивации протонами, чем общая популяция облученных МСК.

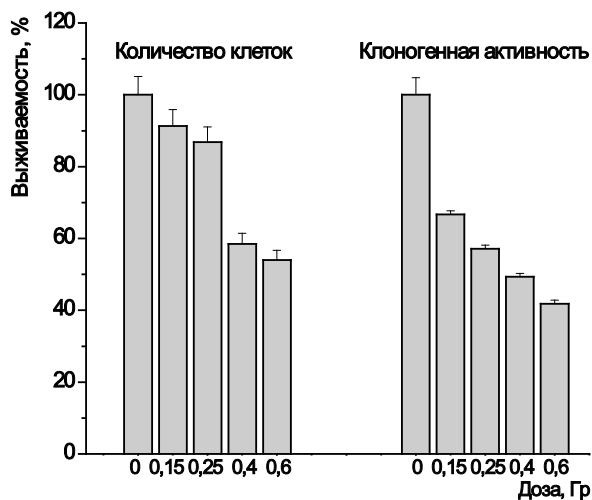


Рисунок 4. Выживаемость МСК после облучения протонами 32 МэВ, оцениваемая по количеству клеток и по их клоногенной активности

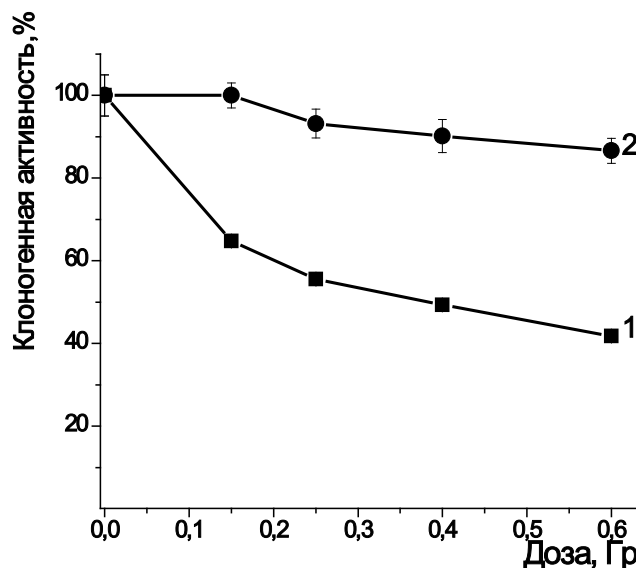


Рисунок 5. Зависимость изменения клоногенной активности МСК от дозы облучения протонами 32 МэВ (1) и дозы гамма-излучения кобальта-60 (2).

При сравнении чувствительности клоногенной активности МСК к облучению протонами и гамма-квантами, показано (рис. 5), что клетки в диапазоне низких доз – от 0,15 до 0,6 Гр более чувствительны к действию протонов. При расчете ОБЭ протонов по полученным данным показано возрастание этого показателя в указанном диапазоне доз от 1,54 до 2,07 (рис. 6).

Следует отметить, что при изучении ОБЭ гамма-нейтронного излучения в диапазоне от 0,5 до 4,0 Гр максимальное значение ОБЭ для МСК из костного мозга мыши, равное 5,5, наблюдали при дозе 0,5 Гр. При увеличении дозы гамма-нейтронного излучения до 2 Гр ОБЭ снижалась до 2,5, а при увеличении до 4,0 Гр – до 2,0 [13]. Поэтому можно полагать, что при более высоких дозах ОБЭ протонов также будет соответствовать более низким значениям. При облучении опухолевых клеток человека высокоэнергетическими протонами показано увеличение ОБЭ с увеличением ЛПЭ при их облучении соответственно в начальной части расширенного пика Брэгга и в его конечной части, когда ЛПЭ достигает максимального значения [14]. Авторами показано, что при увеличении ЛПЭ с 2,85 до 8,14 кэВ/мкм для 37% выживаемости радиочувствительных опухолевых клеток ОБЭ возрастала с 1,16 до 1,40, что коррелировало с более медленной репарацией двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках в этих условиях. При 10% выживаемости ОБЭ для этих клеток возрастала только с 1,06 до 1,24. Мы анализировали ОБЭ для диапазона доз, при которых сохраняется более высокий уровень клоногенной активности МСК, изменявшейся в зависимости от дозы протонов от 66,7 до 41,8%, а ОБЭ при этом составляла от 1,54 до 2,07 (рис. 6) при ЛПЭ протонов, равной 4,0 кэВ/мкм. Полученные нами более высокие значения ОБЭ протонов могут определяться как более низкой энергией использованного протонного пучка и значениями ЛПЭ, соответствующими восходящей ветви кривой Брэгга, так и появлением в этих условиях кластерных более медленно репарируемых ДР ДНК [15;16], а также особенностями самих МСК. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение биологических эффектов высоких доз ускоренных протонов с энергией 32 МэВ.

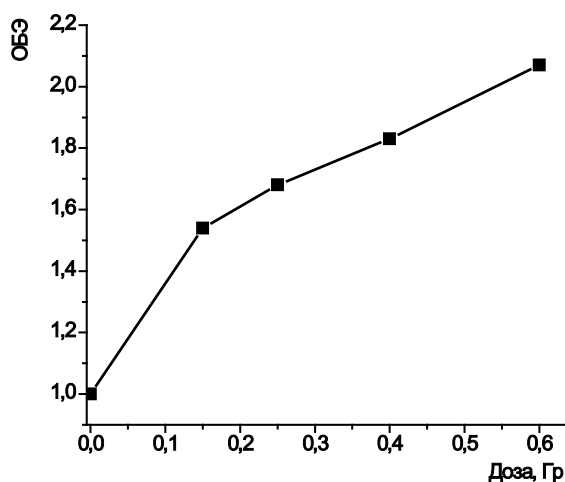


Рисунок 6. Зависимость изменения ОБЭ от дозы облучения МСК мыши протонами 32 МэВ.

Таким образом, на основе дозиметрии с использованием дозиметрической пленки GAFCHROMIC EBT3 и модельных расчетов ЛПЭ протонов с изначальной исходной кинетической энергией 32 МэВ определены параметры облучения культивируемых клеток ускоренными протонами в диапазоне низких доз в области восходящей ветви пика Брэгга на циклотроне У-150. Показано значительно более высокое повреждающее действие низких доз ускоренных протонов с энергией 32 МэВ на нормальные клетки мыши, чем действие гамма-излучения.

Авторы выражают огромную благодарность ведущему инженеру отдела радиационных исследований материалов Курчатковского ядерно-физического комплекса Семенову Евгению Владимировичу за консультации и помощь в написании статьи.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатowski институт» (приказ №1363 от 25.06.2019 г.).

Список литературы / References:

1. Tommasino F., Durante M. Proton radiobiology. *Cancers*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 353-381.
2. Джойнер М.С., Ван дер Когель О.Дж. Основы клинической радиобиологии. Пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013, 600 с. [Joiner M., van der Kogel A., Eds., *Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition*, Hodder Arnold Publication, London, 391 p. (In Russ.)]
3. Jones B. Proton radiobiology and its clinical implications. *Ecancer*, 2017, vol. 11, p. 777.
4. Ворожцова С.В., Иванов А.А. Эффекты поражения и постлучевой репарации хромосомного аппарата клеток эпителия роговицы мышей после облучения протонами с энергией 25 МэВ. *Авиакосмическая и экологическая медицина*, 2012, т. 46, № 4, с. 27-31. [Vorozhtsova S.V., Ivanov A.A. Effects of damage and post-radiation reparation of cornea epithelium cells chromosomal apparatus in mice following irradiation by protons with the energy of 25 MeV. *Aerospace and environmental medicine*, 2012, vol. 46, no. 4, pp. 27-31. (In Russ.)]
5. Хвостунов И.К., Пятенко В.С., Шепель Н.Н., Коровчук О.Н., Голуб Е.В., Жиронкина А.С., Хвостунова Т.И., Лычагин А.А. Анализ хромосомных аберраций в клетках млекопитающих при воздействии различных видов ионизирующего излучения. *Радиация и риск*, 2013, т. 22, № 4, с. 43-59. [Khvostunov I.K., Pyatenko V.S., Shepel N.N., Korovchuk O.N., Golub E.V., Zhironkina A.S., Khvostunova T.I., Lychagin A.A. Analysis of chromosome aberrations induced in mammalian cells after exposure to different types of ionizing radiation. *Radiation and risk*, 2013, vol. 22, no. 4, pp. 43-59. (In Russ.)]
6. Leibacher J., Henschler R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Res. Therapy*, 2016, vol. 7, no. 7, pp.1-12.
7. Gao Z., Zhang Q., Han Y., Cheng X., Lu Y., Fan L., Wu Z. Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice. *Cytotherapy*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 267-73.
8. Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А. Влияние облучения на мезенхимальные стволовые клетки костного и головного и мозга мыши и их способность индуцировать опухоли. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 3, с. 245-256. [Moskaleva E.Y., Semochkina Y.P., Rodina A.V., Chukalova A.A., Posypanova G.A. *Radiation biology. Radioecology*, 2017, vol. 57, no. 3, pp. 245-256. (In Russ.)]
9. François S., Bensidhoum M., Mouiseddine M., Mazurier C., Allenet B., Semont A. et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*, 2006, vol. 24, pp. 1020-1019.
10. Chung H., Lynch B., Samant S. High-precision GAFCHROMIC EBT film-based absolute clinical dosimetry using a standard flatbed scanner without the use of a scanner non-uniformity correction. *J.Appl Clin Med Phys.*, 2010, vol. 11, no. 2, pp. 101-115.
11. Kirby D., Green S., Palmans H., Hugtenburg R., Wojnecki C., Parker D. LET dependence of GafChromic films and an ion chamber in low-energy proton dosimetry. *Phys. Med. Biol.*, 2010, vol. 55, pp. 417-433.
12. Ziegler J.F. SRIM-2003. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research: Section B*, 2004, vol. 219-220, pp. 1027-1036.
13. Семочкина Ю.П., Родина А.В., Москалева Е.Ю., Жорова Е.С., Сапрыкин В.П., Арзуманов С.С., Сафронов В.В. Злокачественная трансформация мезенхимальных стволовых клеток из разных тканей мыши после смешанного гамма-нейтронного облучения in vitro. *Мед. радиология и радиационная безопасность*, 2019, т. 64, № 1, с. 5-14. [Semochkina Yu.P., Rodina A.V., Moskaleva E.Yu., Zhorova E.S., Saprykin V.P., Arzumanov S.S., Safronov V.V. Malignant transformation of mesenchymal stem cells from different mouse tissues after mixed gamma-neutron irradiation in vitro. *Med. radiology and radiation safety*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 5-14. (In Russ.)]
14. Hojo H., Dohmae T., Hotta K., Kohno R., Motegi A., Yagishita A., Makinoshima H., Tsuchihara K., Akimoto T. Difference in the relative biological effectiveness and DNA damage repair processes in response to proton beam therapy according to the positions of the spread out Bragg peak. *Radiat Oncol.*, 2017, vol. 12, p. 111.
15. Oeck S., Szymonowicz K., Wiel G., Krysztofiak A., Lambert J., Koska B., Iliakis G., Timmermann B., Jendrossek V. Relating Linear Energy Transfer to the Formation and Resolution of DNA Repair Foci After Irradiation with Equal Doses of X-ray Photons, Plateau, or Bragg-Peak Protons. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, p. 3779.
16. Ray S., Cekanaviciute E., Lima I., Sørensen B., Costes S. Comparing Photon and Charged Particle Therapy Using DNA Damage Biomarkers. *Int J Particle Ther.*, 2018, vol. 5, no. 1, pp. 15-24.

USING OF FILM DOSIMETRY AND SIMULATION OF THE DEPTH DISTRIBUTION OF THE
ABSORBED DOSE AT THE IRRADIATION OF MOUSE CELLS WITH LOW DOSES OF PROTONS ON
THE U-150 CYCLOTRON

Smirnova O.D., Lukyashin V.E., Semochkina Yu.P., Latushkin S.T., Rodina A.V., Moskaleva E.Yu.

National research center "Kurchatov Institute"

Kurchatov Pl., 1, Moscow, 123182, Russia; e-mail: smirnova0ksana@yandex.ru

Abstract. The sensitivity of cultured mesenchymal stromal stem cells (MSC) obtained from mouse bone marrow to irradiation with 32 MeV protons and the relative biological efficiency (RBE) of protons in the low dose range were studied. The survival of MSCs after irradiation was assessed by the change in the number of cells and in their clonogenic activity. Dosimetry of proton radiation was performed using an EBT3 radiochromic film, which was irradiated under the same conditions as the irradiated cells. For this, the film samples were placed in similar cylindrical tubes in the culture medium, simulating the conditions for irradiation of the cell suspension. The distribution of the energy release of protons during the passage of a particle beam through the samples under study was calculated using the SRIM-2013-Pro software. It has been shown that both the total number of MSCs and the number of MSCs capable of proliferation decrease with an increase in the proton irradiation dose. Moreover, cells with clonogenic activity are more sensitive to inactivation by protons than the general population of irradiated MSCs. When comparing the sensitivity of the clonogenic activity of MSCs to irradiation with protons and gamma rays, it was shown that cells in the range of low doses (from 0.15 to 0.6 Gy) are more sensitive to the action of protons. When calculating the RBE of protons from the data obtained, an increase in this indicator was shown in the indicated dose range from 1.54 to 2.07.

Key words: accelerated particles, protons, linear energy transfer, dosimetry, dosimetry film EBT3, RBE, relative biological effectiveness, gamma radiation, mesenchymal stem cells, clonogenic activity.

КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ ИГРАЮТ КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ АВТОМАТИИ В СИНОАУРИКУЛЯРНОМ УЗЛЕ МЫШИ

Головко В.А.¹, Козловская А.В.²

¹ Институт физиологии – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Коми НЦ УрО РАН»
ул. Первомайская, 50, г. Сыктывкар, 167982, РФ; e-mail: golovko@physiol.komisc.ru

² Сыктывкарский государственный университет им. П. Сорокина
г. Сыктывкар, РФ

Поступила в редакцию: 26.08.20

Аннотация. Исследовали роль калиевых токов в формировании морфологии потенциалов действия клеток истинного водителя ритма (ИВР) в синоаурикулярном (СА) узле мыши. Биофизические параметры регистрировали у клеток спонтанно сокращающихся полосок миокарда с помощью микроэлектродной техники. Фармакологический анализ проводили путем аппликации специфических блокаторов калиевых каналов, а также неселективного канала тока, активируемого гиперполяризацией HCN. Установили, что клетки ИВР располагаются вдоль артерии СА-узла и отличаются самой медленной скоростью нарастания потенциала действия (ПД) в фазу 0. Ивабрадин (3 мМ) замедлял частоту генерации ПД на 24% за счет увеличения скорости фазы медленной диастолической деполяризации (МДД). Е-4031 – блокатор быстрого выходящего калиевого тока, I_{Kr} , влиял на длительность и скорость фазы реполяризации, а в концентрации 1 мМ вызывал увеличение длительности МДД и замедление частоты генерации ПД. Полная блокада I_{Kr} вызывает деполяризацию сарколеммы и прекращение электрической активности. Хроманол 293В блокировал каналы медленного выходящего калиевого тока I_{Ks} . Вклад I_{Ks} в фазу реполяризации составлял 20-30%, а частота генерации ПД замедлялась в среднем на 7%. Проходящий ток I_{to} вносил существенный вклад в частоту генерации ПД клеток СА-узла мыши. Блокатор каналов тока I_{to} (0,5 мМ) вызывал увеличение ДПД₂₀ в среднем на 43%, а в концентрации 5 мМ – на 80%. При этом частота генерации ПД снижалась на 14%. Таким образом, калиевые токи играют ключевую роль в формировании ПД клеток СА-узла мыши и участвуют в модуляции ритма спонтанных сокращений.
Ключевые слова: синоаурикулярный узел, потенциал действия, медленная диастолическая деполяризация, калиевые токи, блокаторы, мышь

Вольтаж – чувствительные калиевые каналы (К-каналы) – это селективные поры на сарколемме миоцитов, способные периодически пропускать ионы K^+ . Механизмы регуляции открывания и закрывания К-каналов установлены [1,2]. Однако функциональная роль калиевых токов до конца не выяснена. Широко используемые для исследования К-каналов методы кристаллографии и криоэлектронной микроскопии не позволяют получить информацию о круговороте ионов K^+ в клетках. Такая информация необходима для фармакологической коррекции нарушений генерации электрической активности в синоаурикулярном (СА) узле, задающем ритм сокращений всего сердца.

Мыши являются удобной моделью для изучения электрофизиологии сердца. Созданы мутантные линии мышей с различными нарушениями сердечной деятельности и, в том числе, функции СА-узла. С использованием мыши получены новые сведения о генетических, молекулярных и системных механизмах, участвующих в возникновении и поддержании сердечных аритмий, приводящих к остановке сердца [3, 4].

Однако, несмотря на значимость для дальнейшего развития исследований, в литературе мало надежной информации об основных электрофизиологических параметрах потенциалов действия клеток синусно-предсердного узла контрольных мышей (wild-type) [5-7]. Особенно это касается активируемого гиперполяризацией тока I_f , который переносится по неселективным HCN-каналам ионами натрия и калия. В обзорных статьях [8, 9] приводятся сведения о том, что вклад тока I_f в спонтанную активность СП-узла некоторых млекопитающих варьировал от 3 до 30%.

Показано, что в клетках СА-области кролика и морской свинки выходящие быстрый и медленный (I_{Kr} и I_{Ks}) калиевые токи задержанного выпрямления участвуют в формировании максимального диастолического потенциала (E_{max}) и фазы реполяризации ПД [10,11]. Вклад I_{Kr} и I_{Ks} в генерацию ПД клеток водителя ритма до сих пор точно не известен. Считается, что у кролика и мыши преобладает I_{Kr} [7,10,12], тогда как у морской свинки оба тока участвуют в равной степени [11]. Вместе с тем, по данным работы [7], хроманол 293В, блокирующий выходящий медленный калиевый ток, не влиял на частоту генерации ПД у мыши.

Cha и соав. [13] методом моделирования проверили данные о вкладе I_{Kr} в реполяризацию ПД для изолированных клеток СА-узла мыши [14]. Подавление I_{Kr} приводило к замедлению частоты на 28%, при этом I_{Ks} можно было в расчет не принимать. Из клинической практики известно, что антиаритмик III класса хроманол 293В может подавлять I_{Ks} . По-видимому, выходящий быстрый калиевый ток играет важную роль в формировании фазы конечной реполяризации ПД и фазы диастолы, тогда как функциональная роль I_{Ks} не вполне понятна.

Целью работы было оценить вклад калиевых токов в формировании морфологии потенциалов действия СА-узла с помощью фармакологического анализа в условиях техники микроэлектродных отведений на модели мыши.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальный протокол соответствовал международным правилам “Для использования лабораторных животных” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8-е издание, опубликованным National Academics Press (США) в 2011 г.).

В экспериментах использовали двухмесячных самцов мышей альбиносов ($n=98$) массой 30 ± 5 г. Животных обезбуживали мгновенным смещением шейных позвонков. Вскрывали грудную полость и извлекали сердце. Изолированное сердце помещали в раствор Тироде (мМ/л): NaCl – 140, NaHCO_3 – 10, KCl – 5,4, CaCl_2 – 1,8, MgSO_4 – 1, глюкоза – 10, HEPES – 5, pH 7,4. Препараты (спонтанно бьющиеся полоски размером $3\times 2\times 0.3$ мм) включали фрагмент *crista terminalis*, сегмент верхней и нижней полых вен. Препарат помещали в экспериментальную камеру с перфузируемым раствором Тироде (температура 30 ± 1 °C), раствор аэрировали газовой смесью (O_2 – 95% и CO_2 – 5%). Блокаторы ионных каналов добавляли в солевой раствор в нужной концентрации. Продолжительность действия блокаторов 15-30 мин. Если препарат отмывался до стационарного уровня, то эксперимент продолжали.

ПД регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов с начальным сопротивлением 40-60 МΩ. Анализировали 15 биофизических параметров ПД клеток СА узла мыши, работающих в режиме истинного водителя ритма (ИВР). Обработку данных проводили в программе BIOSTAT 4.03. Использовали непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок и U-критерий Манна–Уитни для несвязанных. Различия считали значимыми при $p<0,05$. Данные представлены как средняя арифметическая со стандартной ошибкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки водителя ритма локализовались вдоль артерии СА-узла. ПД, зарегистрированные в зоне бифуркации артерии имели $dV/dt_{\max}$ фазу 0 равную в среднем 3 ± 1 В/с (n полосок = 28). Уровень $E_{\max}$ был равен – 54 мВ, а пороговый потенциал составлял -42 ± 5 мВ при частоте 294 ± 30 имп./мин (рис. 1 А-Г).

Эффекты ивабрадина – специфического блокатора, активируемого гиперполяризацией тока I_f исследовали в диапазоне концентраций от 0.01 до 3 мМ. Анализ данных показал, что пороговая концентрация ивабрадина для клеток ИВР СА-узла мыши составила 0.08 мМ. Концентрация, вызывающая 50% замедление (EC_{50}) V_4 была равна 0,4 мМ. Ивабрадин на 5 минуте экспозиции вызывал увеличение длительности МДД от 80 до 130 мс (рис. 1 Б). В результате величина V_4 снижалась наполовину, а частота генерации ПД – на 25% по сравнению с контролем. Следовательно, ивабрадин замедлял частоту генерации ПД, главным образом, за счет увеличения длительности и снижения скорости фазы медленной диастолической деполяризации.

Метилсульфонанилид (Е-4031) блокирует ток I_{K_r} . Е-4031 в диапазоне концентрации от 0,01 до 1 мМ дозозависимо снижал скорость фазы конечной реполяризации и увеличивал ДПД₉₀. В результате замедлялась частота генерации ПД. В концентрации 0.5 мМ блокатор вызывал увеличение ДПД₉₀ в среднем на 20-25% ($n=6$). Амплитуда ПД снижалась за счет деполяризации $E_{\max}$ от –53 до –46 мВ, длительность МДД увеличивалась на 37%. Частота генерации ПД снижалась на 25% по сравнению с контролем (рис. 1 Д).

Хроманол 293В блокирует каналы тока I_{K_s} . Нами установлено, что аппликация хроманола 293В (5 мМ) вызывала повышение $E_{\max}$ от –52 до –55 мВ ($n=6$) и смещала уровень порогового потенциала на 4 мВ в сторону позитивности (рис.1 В). Несмотря на то, что скорость фазы МДД увеличивалась, частота генерации ПД снижалась в среднем на 7% (6-20%) по сравнению с контролем (рис. 1 Д). Следовательно, чувствительность к хроманолу проявляли параметры ПД, связанные с величиной порогового потенциала ДПД₉₀ и скоростью фазы конечной реполяризации.

Соединение 4 – аминопиридин является блокатором каналов проходящего тока I_{to} . Изучение эффектов 4-АП в диапазоне концентрации от 0,05 до 5 мМ на биофизические параметры ПД показало, что блокатор в концентрации 0.5 мМ вызывал наибольшее (в среднем на 43%) увеличение длительности ПД на уровне 20% реполяризации (ДПД₂₀) (рис. 1 В). Это приводило и к увеличению ДПД₉₀. Минимальная (пороговая) концентрация 4-АП, оказывающая действие на клетки работающие в режиме ИВР составляла около 0,3 мМ. Повышение концентрации 4-АП от 1 до 5 мМ вызывало увеличение ДПД₂₀ на 80% и замедление частоты генерации ПД на 14% по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о том, что у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, 4-АП удлинит ДПД₂₀ и снижал $dV/dt_{\max}$, что приводило к снижению частоты генерации ПД.

Итак, нами определены параметры ПД клеток СА-узла мыши и выявлены эффекты блокаторов калиевых каналов, а также неселективного канала HCN4 тока, активируемого гиперполяризацией, I_f . Имеющиеся в литературе сведения о биофизических параметрах ПД клеток СА-узла мыши единичны и противоречивы [5,6,15, 16]. Зарегистрированные нами параметры ПД наиболее сходны с данными, полученными на полосках СА-области мыши [6]. Наши данные микроэлектродной идентификации клеток показали, что в зоне бифуркации

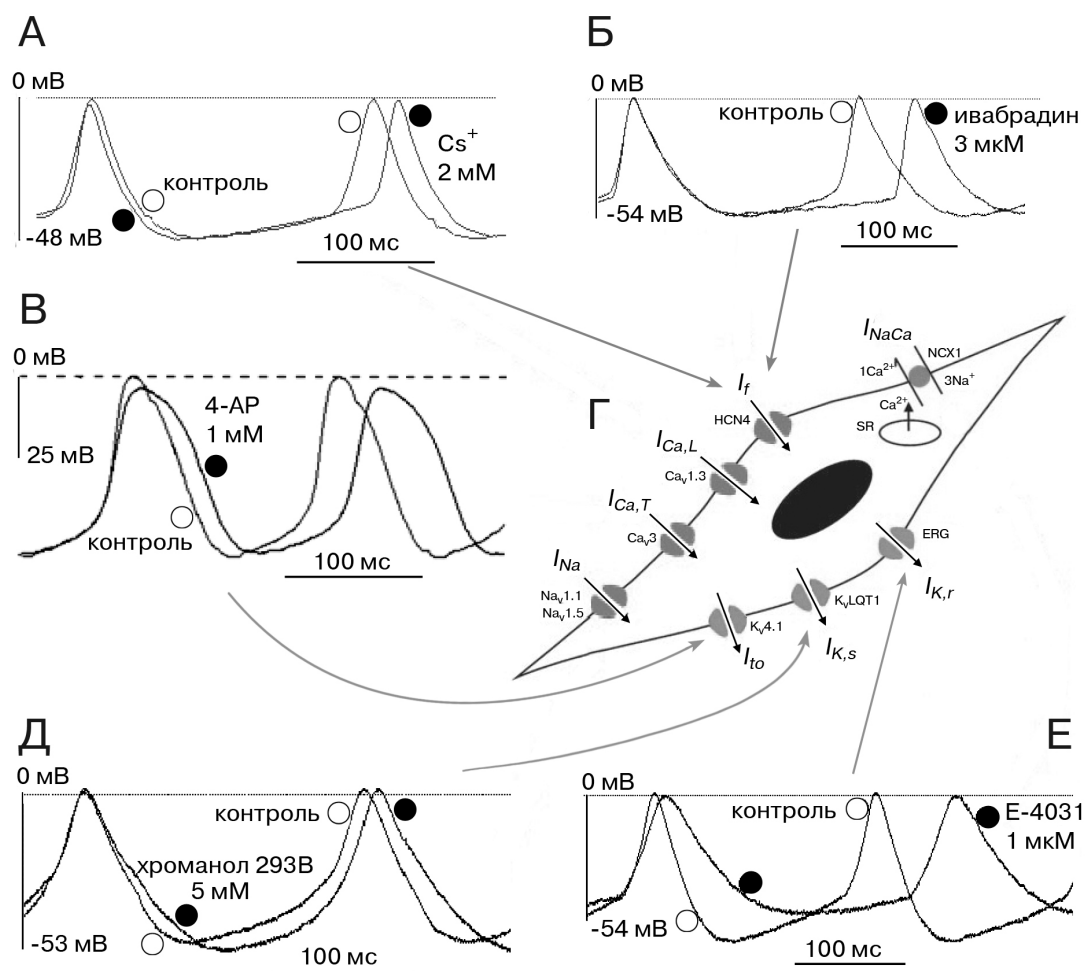


Рисунок 1. Влияние специфических блокаторов ионных каналов на конфигурацию ПД клеток с самой медленной dV/dt_{max} в СА узле мыши: А и Б – эффекты ивабрадина и CsCl, В – эффекты 4-аминопиридина; Г – схема ионных токов на сарколемме клетки ИВР; Д – эффекты хроманола 293В; Е – эффекты Е-4031

артерии располагается центральная часть СА-узла сердца мыши. Частота генерации ПД клеток СА-узла мыши составляет в среднем около 400 имп./мин., что в 2-3 раза больше, чем у подавляющего числа млекопитающих (кролик, морская свинка, собака и др.). Это накладывает отпечаток на параметры ПД, что ставит под сомнение корректность сопоставления мыши с другими млекопитающими.

Подавляющая часть данных о вкладе тока, активируемого гиперполяризацией, I_f , в автоматию СА-узла получена на сердце кролика [17]. Специфический блокатор данного тока CsCl (2 mM) вызывал уменьшение частоты генерации ПД клеток СА-узла кролика на 3-20% за счет уменьшения скорости МДД [8]. Ивабрадин в концентрации 3 μM понижал частоту сердцебиений изолированного перфузированного сердца мыши на 35% [18]. В наших опытах на изолированных полосках СА-узла мыши ивабрадин (3 мкМ) понижал частоту генерации ПД на 25% по сравнению с контролем, в основном за счет увеличения длительности и снижения скорости фазы медленной диастолической деполяризации. Следовательно, можно полагать, что вклад тока, активируемого гиперполяризацией, I_f , составляет 20-30% и не является единственным в формировании фазы МДД (рис. 1 А). Возможно, его функция состоит в стабилизации спонтанного ритма. Установлено, что мутации гена *HCN4*, кодирующего белки каналов тока I_f , связаны с развитием аритмий у мыши и человека [4, 19].

Выходящий быстрый калиевый ток, I_{Kr} , является важным током, регулирующим фазу реполяризации ПД. Его деактивация приводит к смещению потенциала покоя. Имеющиеся данные, свидетельствуют о том, что данный ток является определяющим в сердце кролика [10] и изолированного сердца мыши [12]. При экспозиции блокатора Е-4031 отмечали замедление частоты сердцебиений на 35-70%. Мы установили, что пороговая концентрация блокатора Е-4031 для клеток ИВР мыши составляла около 0,01 μM. Аппликация блокатора в концентрации 0,5 μM вызывала эффект только на длительность и скорость фазы реполяризации. Повышение концентрации до 1 μM вызывало увеличение длительности МДД и замедление частоты генерации ПД. Таким образом, замедление I_{Kr} в момент превалирования входящего тока I_f приводит к увеличению длительности МДД и замедлению скорости фазы медленной диастолической деполяризации. Полная блокада I_{Kr} может вызвать деполяризацию сарколеммы и прекращение электрической активности.

Вклад медленного калиевого тока I_{Ks} в формировании ПД в клетках СА-узла мыши остается дискуссионным. Высказано мнение, что у мелких животных (мышь, крыса) преобладает I_{Kr} , а I_{Ks} отсутствует или инактивирован

[20]. Некоторые исследователи предполагают, что преобладание I_{Kr} является одним из механизмов адаптации к высокой частоте сердцебиений [21]. При помощи методики «patch-clamp» на изолированных клетках СА-узла мыши не зарегистрировали общего выходящего калиевого тока при экспозиции хроманола. В наших опытах хроманол 293В блокировал каналы тока I_{Ks} . Мы оцениваем его вклад в фазу реполяризации в 20-30%. Частота генерации ПД замедлялась в среднем на 7%.

Ток I_{to} вносит существенный вклад в частоту генерации ПД клеток СА-узла мыши. Об этом свидетельствует тот факт, что 4-АП блокатор каналов тока I_{to} в концентрации 0.5 мМ вызывал увеличение ДПД₂₀ в среднем на 43%, а в концентрации 5 мМ – на 80%. В результате частота генерации ПД снижалась на 10 и 16%, соответственно. Представляется перспективным использование препаратов на основе пиридина, которые могут тонко регулировать частоту генерации ПД в клетках СА-узла, увеличивая длительность фазы плато.

Таким образом, калиевые токи играют ключевую роль в формировании ПД клеток СА-узла мыши и участвуют в модуляции ритма спонтанных сокращений.

Список литературы/References:

1. Bartos D.C., Grandi E., Ripplinger C.M. Ion channels in the heart. *Compr Physiol.*, 2015, vol. 5, pp. 1423-1464.
2. Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.*, 2000, vol. 80, pp. 555-592.
3. Stieber J., Hofmann F., Ludwig A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2004, vol. 14, pp. 23-28.
4. Herrmann S., Fabritz L., Layh B., Kirchhof P., Ludwig A. Insights into sick sinus syndrome from an inducible mouse model. *Cardiovasc. Res.*, 2011, vol. 90, pp. 38-48.
5. Mangoni M.E., Nargeot J. Properties of the hyperpolarization-activated current I_f in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc. Res.*, 2001, vol. 52, pp. 51-64.
6. Verheijck E.E., van Kempen M.J., Veereschild M., Lurvink J., Jongsma H.J., Bouman L.N. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc. Res.*, 2001, vol. 52, pp. 40-50.
7. Cho H.S., Takano M., Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J. Physiol.*, 2003, vol. 550, pp. 169-180.
8. Vinogradova T.M., Bogdanov K.Y., Lyashkov A.E. et al. Rhythmic Ca^{2+} oscillatory drive sinoatrial nodal cell pacemaker function to make the heart tick. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, vol. 1047, pp. 138-156. DOI: 10.1196/annals.1341.013.
9. Lakatta E.G., DiFrancesco D. What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2009, vol. 47, pp.157-170.
10. Verheijck E.E., van Ginneken A.C., Bourier J., Bouman L.N. Effects of delayed rectifier current blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. *Circ. Res.*, 1995, vol.76, pp. 607-615.
11. Matsuura H., Ehara T., Ding W.G., Omatsu-Kanbe M., Isono T. Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K^+ current in guinea-pig sinoatrial node pacemaker cells. *J. Physiol.*, 2002, vol. 540, pp. 815-830.
12. Clark R.B., Mangoni M.E., Lueger A., Couette B., Nargeot J., Giles W.R. A rapidly activating delayed rectifier K^+ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2004, vol. 286, pp. 1757-1766.
13. Cha C.Y., Himeno Y., Shimayoshi T., Amano A., Noma A. A novel method to quantify contribution of channels and transporters to membrane potential dynamics. *Biophys. J.*, 2009, vol. 97, pp. 3086-3094.
14. Kharche S., Yu J., Lei M., Zhang H. A mathematical model of action potentials of mouse sinoatrial node cells with molecular bases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. 945-963.
15. Lei M., Jones S.A., Liu J., Lancaster M.K., Fung S.M., Dobrzynski H., Camelliti P., Maier S.K.G., Noble D., Boyett M.R. Requirement of neuronal and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J. Physiol.*, 2004, vol. 559, pp. 835-848.
16. Golovko V.A., Gonotkov M.A., Lebedeva E.A. Effects of 4-aminopyridine on action potentials generation in mouse sinoauricular node strips. *Physiological Reports*, 2015, vol. 3 (7), p. e12447. DOI: 10.14814/phy2.12447:1-8.
17. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ. Res.*, 2010, vol.106, pp. 434-446.
18. Liu J., Dobrzynski H., Yanni J., Boyett M. R., Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc. Res.*, 2007, vol. 73, pp. 729-738.
19. Schulze-Bahr E., Neu A., Friederich P., Kaupp U. B., Breithardt G., Pongs O., Isbrandt D. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest.*, 2003, vol. 111, pp. 1537-1545.
20. Ono K., Shibata S., Iijima T. Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sinoatrial node cells. *J. Physiol.*, 2000, vol. 524, pp. 51-62.
21. Lei M., Honjo H., Kodama I., Boyett M. R. Heterogeneous expression of the delayed-rectifier K^+ currents I_{Ks} and I_{Kr} in rabbit sinoatrial node cells. *J. Physiol.*, 2001, vol. 535, pp. 703-714.

THE POTASSIUM CHANNELS PLAY A PIVOTAL ROLE IN FORMATION OF AUTOMATICITY IN THE MOUSE SINOAURICULAR NODE

Golovko V.A.¹, Kozlovskaya A.V.²¹Institute of Physiology, Komi Science Centre URD RAS

Pervomaiskaya st., 50, Syktyvkar, 167982, Russia; e-mail: golovko@phisiol.komisc.ru

² P. Sorokin Syktyvkar State University

Syktyvkar, Russia

Abstract. The role of potassium currents in the formation of action potential morphology of true pacemaker cells in the mouse sinoauricular node (SAN) was studied. Biophysical parameters were recorded in cells using microelectrode. Pharmacological analysis was performed by applying specific potassium channel blockers, as well as a non-selective current channel activated by hyperpolarization HCN. It was found that the true pacemaker cells are located along the SAN artery and differ in the slowest velocity of action potential (AP) upstroke $dV/dt_{\max}$ (≈ 3 V/s). Ivabradine (3 μ mol) decreased the frequency of AP generation by 24% due to an increase in the duration and velocity of the slow diastolic depolarization (SDD) phase. E4031 - blocker of fast inward potassium current, I_{Kr} , affected the duration and velocity of the repolarization phase. E4031 (1 μ mol) caused an increase in SDD duration and a decreased in the frequency of AP generation. Complete inhibition of I_{Kr} channels can cause depolarization of the sarcolemma and blocks of electrical activity. Chromanol 293B blocked the channels of slow inward potassium current, I_{Ks} . The contribution of I_{Ks} to the repolarization phase was 20-30%. The frequency of AP generation slowed down by an average of 7%. The I_{to} current made a significant contribution to the frequency of AP generation in SAN cells of the mouse. 4-AP aminopyridine – blocker of I_{to} channels (0.5 mmol) caused an increase in AP duration by an average of 43%, and in the concentration of 5 mmol – by 80%. At the same time, the frequency of AP generation decreased by 14%. Thus, potassium currents play a key role in the formation of AP in the mouse CA node cells and participate in the modulation of the rhythm of spontaneous contractions.

Key words: sinoauricular node, action potential, slow diastolic depolarization, potassium currents, blockers, mouse.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СПЕКТРАЛЬНЫЕ И ЭМИССИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ШТАММОВ МОРСКИХ ФОТОБАКТЕРИЙ

Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Исмаилов А.И.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, РФ; e-mail: anvaris@list.ru

Поступила в редакцию: 20.07.2020

Аннотация. Установлено, что низкотемпературные светящиеся бактерии, обладают специфическими эмиссионными и спектральными характеристиками. *In vivo* все выделенные штаммы продуцируют интенсивную биoluminesценцию (до 10^5 квант/с.кл) с максимумами свечения около 478-480 нм со плечами при 500-510 и 530-540 нм. Проведено разложение спектров при разных температурах. Суммарный спектр хорошо разлагается на 3 составляющие, соответствующие люциферазному, BFP и YFP эмиттерам. Проведен анализ температурной зависимости биoluminesценции клеток при длинах волн, соответствующих максимумам эмиссии компонентов в диапазоне активации (4-20°C) и спада (22-32°C) биoluminesценции интерпретируется присутствием в низкотемпературных видах бактериях вспомогательных эмиттеров, которые в комплексе с люциферазой участвуют в процессе биoluminesценции.

Ключевые слова: фотобактерии, биoluminesценция, *Photobacterium phosphoreum*.

Основные данные по спектрам биoluminesценции получены на бактериях групп *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, в меньшей степени исследованы бактерии группы *Photobacterium*. Фотобактерии мезофильных штаммах *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* излучают свет с максимумом при ~495 нм. В роли эмиттера функционирует связанный на люциферазе 4а-гидроксифлавин. Бактерии группы *P. phosphoreum* и штамм *Vibrio fischeri* Y1 излучают нестандартную биoluminesценцию из-за участия в эмиссионном процессе эмиссии света дополнительных эмиттеров. Спектр биoluminesценции бактерий группы *P. phosphoreum* голубоватый, с максимумом 476-480 нм, у бактерий *Vibrio fischeri* Y1 желтое свечение с максимумом при 530-540 нм. Установлено, что бактерии *P. phosphoreum* продуцируют, т.н. голубой флуоресцентный белок (BFP) который ассоциируясь с люциферазой меняет длину волны излучения с «люциферазной», на более коротковолновую, – 476-480 нм [1, 2]. Эмиссионным хромофором BFP является 6,7-диметил-8-(рибитил)люмазин. Показано, что бактерии *V. fischeri* Y1, содержат другой флуоресцентный белок – YFP, вызывающий сдвиг свечения в длинноволновую область. Флуорофором функционирует связанный на белке FMN. В спектре биoluminesценции проявляются две полосы, первый при 490 нм. – эмиссия люциферазы, второй при 540 нм, – эмиссия YFP [3]. Также установлено [4], что *P. phosphoreum* str. bmFP, выделенный из донных отложений на глубине 500 м, продуцирует димерный белок, испускающий бимодальную (488 и 517 нм) флуоресценцию, который способен ассоциироваться с люциферазой.

Установлено [5], что психрофильные бактерии, выделенные из рыб арктических морей при низкой температуре *in vivo* продуцируют интенсивную биoluminesценцию с максимумами излучения около 478-480 нм со слабо выраженными плечами при 500-510 и 530-540 нм. Сложную картину спектра биoluminesценции можно обосновать присутствием в данных бактериях различных вспомогательных белков, которые в комплексе с люциферазой участвуют в процессе биoluminesценции. Очевидно, что при соизмеримой эмиссионной активности, все хромопротеины должны проявляться в спектрах свечения. Удельная биoluminesцентная активность выделенных психрофильных штаммов на полтора-два порядка выше, чем у мезофильных. При высокой интенсивности эмиссии клеток анализ спектров биoluminesценции возможен при низких температурах, позволяющих получить более выраженную картину спектра.

Целью данной работы был анализ спектрального распределения биoluminesценции *in vivo* при разных температурах и анализ спектров флуоресценции бесклеточного экстракта и белковой фракции симбиотических низкотемпературных фотобактерий, выделенных из рыб арктических морей.

На рисунке 1 представлен типичный спектр биoluminesценции интактных клеток бактерий одного из изолированных штаммов фотобактерий. Спектр свечения имеет неявно выраженный максимум при 478 нм, с широкой полосой близких значений интенсивности эмиссии в диапазоне 470-510 нм.

Исходя из того, что бактерии относятся к группе *P. phosphoreum*, которые содержат кроме люциферазы и дополнительные эмиттерные белки, можно было полагать, что эмиссионный максимум сформирован как суперпозиция двух компонентов (флавинового и люмазинового) с близкими полосами эмиссии, 495 и 476 нм, соответственно. Предположительно плечо при 530 нм может указывать присутствию дополнительного эмиттера сходного с YFP бактерий *V. fischeri* Y-1. В пользу такого предположения говорит тот факт, что эти бактерии, с желто-зеленой биoluminesценцией, содержат белок, аналогичный BFP, который обеспечивает голубое свечение бактерий *P. phosphoreum*.

Нижеследующие эксперименты проведены исходя из предположения, что эмиссионная активность основного (люциферазного) и вспомогательных (люмазинового и YFP) эмиттеров может различаться по

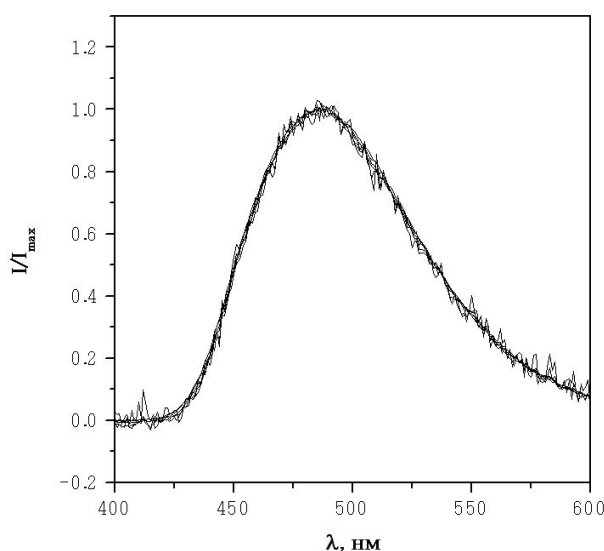


Рисунок 1. Спектр биолуминесценции изолированных клеток *P.phosphoreum* в 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,5 + 2% NaCl, 4°C

температурной зависимости. Соответственно, был проведен анализ температурной зависимости биолуминесценции при трех длинах волн, соответствующих максимумам эмиссии этих компонентов в диапазоне активации (4-20°C) и спада (22-32°C) биолуминесценции:

На рисунке 2 представлена температурная зависимость биолуминесцентной активности интактных клеток при трех длинах волн: 475, 500 и 530 нм. Установлено, что в данных условиях неявно выраженный максимум свечения для всех выбранных длин волн находится при ~20°C.

Выявлено, что температура отражается на всех спектральных характеристиках: положении максимума, ширине базовой линии, амплитуде ответа. Основываясь на различиях в этих параметрах, можно предполагать, что выделенные штаммы психрофильных фотобактерий содержат ассоциированные с люциферазой вторичные эмиттерные белки, способные изменять спектр биолуминесценции.

Проведен кинетический анализ температурной зависимости. Кинетические константы оценивались в двух диапазонах: активационном (2-20°C) и затухающем (22-32°C). В области нарастания интенсивности эмиссии (4-20°C) изменения при длинах волн 480 и 495 нм протекают с близкими константами скорости реакции (псевдопервого) порядка, но отличается от константы скорости реакции для 530 нм. В области затухания люминесценции в области 20-32°C кинетические зависимости для 480 и 495 нм меняются с близкими константами, но существенно отличаются от константы при 530 нм.

Проведено теоретическое разложение спектров (рис. 3). Суммарный спектр хорошо разлагается на 3 составляющие, соответствующие люциферазному, BFP и YFP эмиттерам.

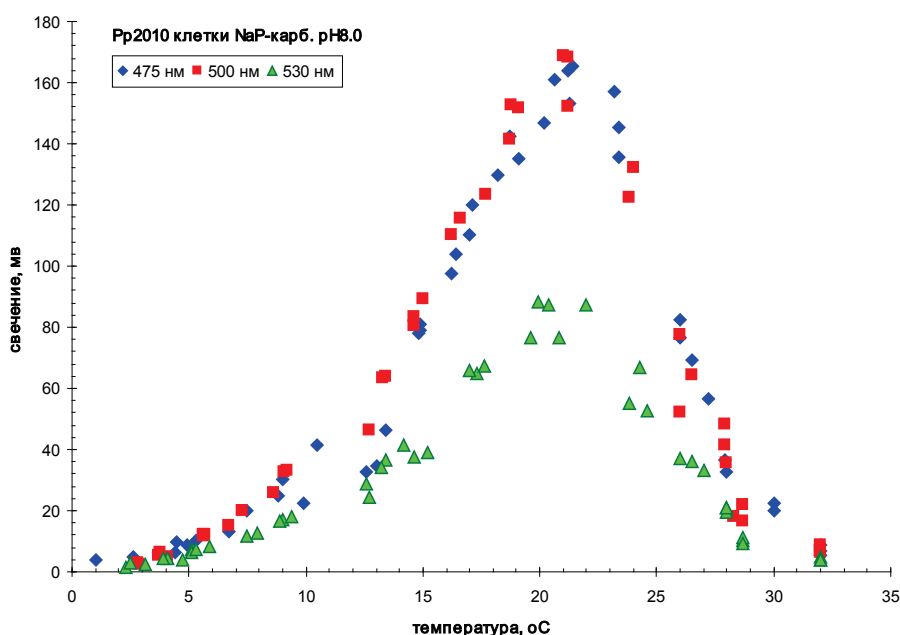


Рисунок 2. Температурная зависимость эмиссии интактных клеток при трех (475, 500, 530 нм) длинах волн. Среда измерения: 0,1 М Na- фосфатный буфер, 2% NaCl, pH 7,5

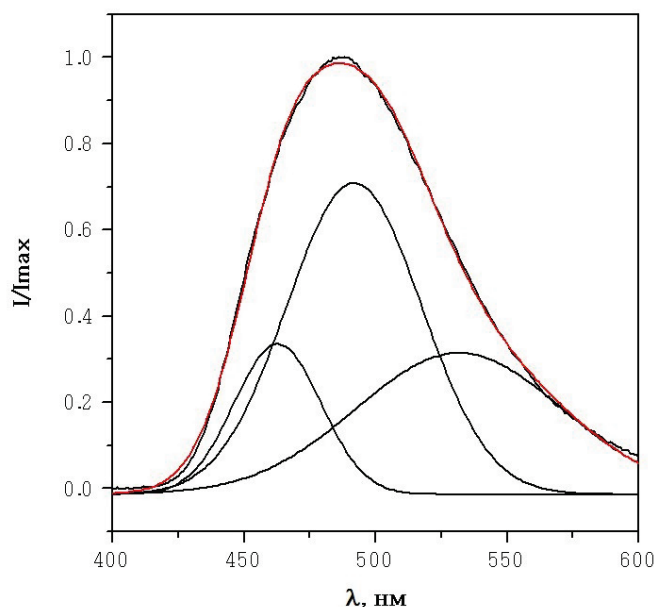


Рисунок 3. Спектры фотобактерий

Подтверждение наличия у бактерий вспомогательных эмиттеров вытекает из спектров флуоресценции бесклеточного экстракта и 30-80% белковой фракции из этих бактерий.

На рисунок 4 представлены спектры возбуждения и эмиссии компонентов бесклеточного экстракта фотобактерий.

При возбуждении с длиной волны 460 нм наблюдается одна широкая полоса эмиссии с максимумом около 540 нм. Можно полагать, что основной вклад во флуоресценцию в этой области вносит свободный флаavin. При возбуждении 380 нм в спектрах эмиссии проявляются два пика около 450 и 510 нм с плечом при 530 нм. Необходимо отметить, что в экстракте бактерий *V. fischeri* Y-1 также отмечена эмиссия с максимумом 540 нм при возбуждении с длиной волны 400 нм, которая может соответствовать желтому флуоресцирующему белку YFP. Спектры возбуждения флуоресценции для эмиссии при 460 нм проявляет полосы с максимумами при 350 нм и плечами при 360 и 380 нм. Для эмиссии при 530 нм спектр возбуждения имеет доминантный пик при 470 нм и дополнительный при 455 нм. Для исключения вклада свободных флуоресцентных компонентов проведен спектральный анализ на суммарной фракции белков, – 30-80% сульфат аммония. При возбуждении с длиной волны 390 нм в белковой фракции проявляются три полосы эмиссии с максимумами 480, 520, 580 нм. Можно полагать, что эти флуоресцирующие компоненты могут, ассоциируясь с основным эмиттером – люциферазой, вовлекаться в эмиссионный процесс. Спектральная картина возбуждения и эмиссии бесклеточного экстракта и

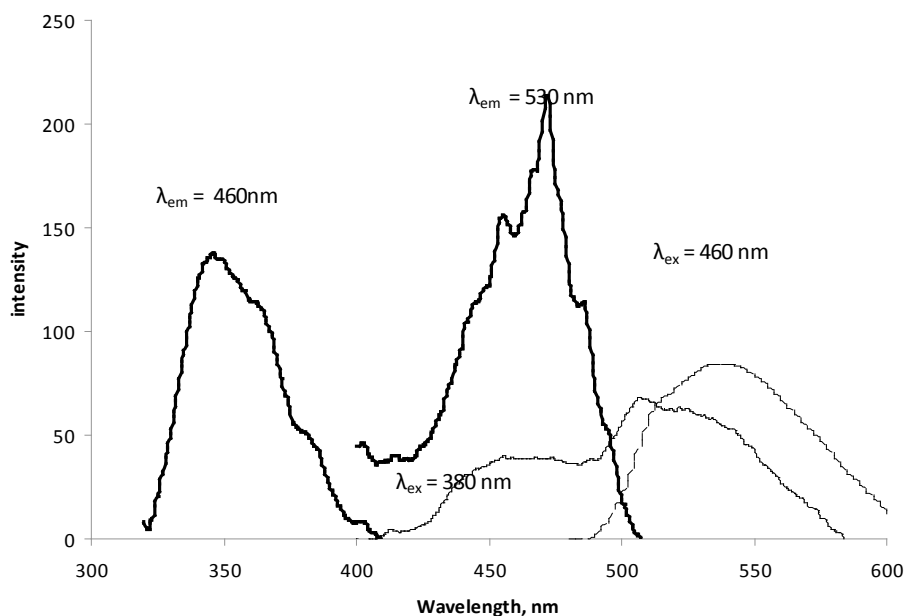


Рисунок 4. Спектры возбуждения и эмиссии бесклеточного экстракта бактерий *P. phosphoreum* в 50 мМ фосфатном буфере + 2% NaCl, pH 7,5 при 20°C

белковой фракции по некоторым полосам сходна с бимодальным спектром белков у ранее описанного штамма бактерий *P. phosphoreum*, и частично со спектром бесклеточного экстракта бактерий *V. fischeri* Y-1.

Таким образом, в результате проведенного спектрального и кинетического анализа получены данные, свидетельствующие, что голубоватая биолюминесценция низкотемпературных фотобактерий группы *P. phosphoreum* из арктических морей может быть сформирована с участием как минимум двух (люциферазного и люмазинового) эмиттеров.

Список литературы / References:

1. Wilson Th., Hastings W. Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Development Biology*, 1998, vol. 14, pp. 197-230.
2. Eckstein J., Cho K., Colepicolo P., Ghisla S., Hastings J., Wilson T. A time-dependent bacterial bioluminescence emission spectrum in an in vitro single turnover system: Energy transfer alone cannot account for the yellow emission of *Vibrio fischeri* Y1. *PNAS*, 1990, vol. 87, no. 4, pp. 1466-1470.
3. Karatani H., Wilson T., Hastings J. A blue fluorescent protein from a yellow-emitting luminous bacterium. *Photochemistry and photobiology*, 1992, vol. 55, no. 2, pp. 293-299.
4. Karatani H., Konaka T., Katsukawa Ch. Properties of the bimodal fluorescent protein produced by *Photobacterium phosphoreum*. *Photochemistry and photobiology*, 2000, vol. 71, no. 2, pp. 230-236.
5. Kuts V.V., Ismailov A.D. Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea. *Microbiology-(Russia)*, 2009, vol. 78, no. 5, pp. 554-558.

SPECIFIC SPECTRAL AND EMISSION CHARACTERISTICS OF LOW-TEMPERATURE STRAINS OF MARINE PHOTOBACTERIA

Aleskerova L.E., Alenina K.A., Ismailov A.D.

Moscow State University

Moscow, Leninskie Gory, 1, bldg. 12, e-mail: anvaris@list.ru

Abstract. It has been established that low-temperature luminous bacteria have specific emission and spectral characteristics. In vivo, all isolated strains produce intense bioluminescence (up to 105 quant/s. per cell) with luminescence maxima of about 478-480 nm with shoulders at 500-510 and 530-540 nm. The spectra were decomposed at different temperatures. The total spectrum is well decomposed into 3 components corresponding to luciferase, BFP and YFP emitters. The analysis of the temperature dependence of cell bioluminescence at wavelengths corresponding to the emission maxima of these components in the range of activation (4-20°C) and decay (22-32°C). The bioluminescence spectrum is interpreted by the presence in low-temperature photobacteria species the auxiliary emitters, which, in combination with luciferase, participate in the bioluminescence process.

Key words: photobacteria, bioluminescence, *Photobacterium phosphoreum*.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОРСКИХ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ АРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

Аленина К.А., Алескерова Л.Э., Исмаилов А.Д.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, РФ; e-mail: anvaris@list.ru

Поступила в редакцию: 20.07.2020

Аннотация. Изучены физиологические и эмиссионные характеристики новых, выделенных из акваторий Белого, Берингова и Охотского морей симбиотических светящихся бактерий. Установлено, что все выделенные штаммы независимо от способов существования и мест обитания относятся к группе психрофильных фотобактерий *Photobacterium phosphoreum*. Все штаммы отличаются высокостабильной биолюминесценцией при глубинном культивировании в диапазоне температур 4-20°C. Выявлены наиболее важные факторы, определяющие эмиссионную активность и стабильность свечения интактных клеток фотобактерий. Показано, что наиболее критическим фактором для свечения является температурный режим культивирования и инкубации бактерий.

Ключевые слова: биолюминесценция, фотобактерии, светящиеся бактерии, *Photobacterium phosphoreum*.

Светящиеся бактерии обладают характерным географическим и сезонным распределением видов в акваториях морей и океанов. Установлена прямая связь между температурным режимом среды обитания и таксономической композицией видов фотобактерий [1, 2]. Выявлено, что в глубинах океанов ниже 300 м, доминирует только один вид бактерий *Photobacterium phosphoreum*. Планктонные формы в холодных зонах морей и океанов не встречаются. *Vibrio harvey*, *Vibrio fischeri* и другие мезофильные виды распределяются в поверхностных слоях при более высоких температурах. Светящиеся бактерии Арктических морей исследованы крайне ограниченно. Представлены физиологические спектральные и эмиссионные характеристики фотобактерий Белого моря [3], фотобактерии Берингова и Охотского морей практически не изучены.

В соответствии с литературными данными [1-3] среда обитания формирует вид фотобактерий. Кроме того, выявлено, что в качестве эндосимбионтов донных рыб фотобактерии преимущественно проявляются как *Photobacterium phosphoreum*, хотя, могут присутствовать и другие виды. Температурный режим арктических морей соответствует условиям существования фотобактерий в глубинах океанов. Что позволяет предполагать, что фотобактерии в этих зонах могут существовать только как симбионты внутренних органов рыб или беспозвоночных. Особую значимость исследованиям низкотемпературных фотобактерий придает возможность их использования в качестве биосенсоров в тест системах биомониторинга токсинов [4].

В данной работе представлен анализ специфических кинетических и эмиссионных свойства светящихся бактерий, выделенных из кишечника рыб: корчака европейского *Mioxocephalus scorpius*, палтуса белокорого *Hippoglossus hippoglossus*, камбалы *Pleuronectes platessa* Белого, Берингова и Охотского морей. Все выделенные штаммы симбиотических фотобактерий по биолюминесцентным, физиологическим и ростовым признакам соответствовали психрофильным бактериям группы *P. phosphoreum*. Вместе с тем были выявлены незначительные различия в спектрах эмиссии, кинетике роста и свечения, что могло указывать на гетерогенность популяций низкотемпературных симбиотических штаммов светящихся бактерий.

Настоящая работа выполнена в целях изучения биоразнообразия светящихся организмов Арктических морей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование бактерий описано в работах [3]. Интактные клетки получали после центрифугирования (4000 g, 20 мин) и однократного отмывания 0,1М Na-фосфатным буфером с 2% NaCl, pH 7,6. Отмытые клетки ресуспендировали в той же буферной среде и хранили в холодильнике при 4°C. Биомассу контролировали по оптической плотности при 660 нм на спектрофотометре «Beckman-26» (США). Люминесценцию регистрировали на люминометре 1250 LKB-Wallac (Швеция-Финляндия). Температурные зависимости снимали на фотометре с термостатируемым кюветным отделением и термодатчиком. Интенсивность эмиссии выражали в относительных единицах (ОЕ) или в абсолютных величинах выхода фотонов (квант/с.кл). Установки калибровались по стандарту Гастингса, Вебера [5].

Температурные зависимости эмиссии изолированных клеток снимали в 2 % NaCl, 0,1М Na-фосфатный буфере с 2% NaCl, pH 7,5, или в среде для глубинного культивирования (СК). Концентрация клеток в пробах $\sim 10^7$ кл/мл.

Удельную скорость роста рассчитывали из графика в полулогарифмических координатах: $\ln N / t$, где N – концентрация клеток, кл/мл, t – время, ч. Общий выход фотонов при выращивании бактерий рассчитывали, как светосумму от начала культивирования до падения свечения ниже 0,1 % по отношению к максимальной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост и люминесцентная активность.

Сравнительный анализ биолюминесцентных и физиологических параметров 14 штаммов, выделенных из разных акваторий, показал ряд общих признаков. Все выделенные штаммы обладали ярким голубоватым свечением с выходом фотонов в оптимизированных условиях до 10^5 квант/с.кл. Спектры биолюминесценции выделенных штаммов близки. Основная полоса с широким максимумом при 478 ± 2 нм, проявляется плечо при 500–515 нм. Необходимо отметить, что специфический спектр биолюминесценции с максимумом при 476–480 нм и плечом в области 500–515 нм является характерным видовым признаком для бактерий группы *P. phosphoreum*. У бактерий *Vibrio harvey*, *Vibrio fischeri* максимум эмиссии сдвинут в длинноволновую область (495–500 нм.), у *V. fischeri* Y-1 максимум при 530 нм.

Рост и свечение в глубинной культуре

На рисунке 1 представлена типичная динамика роста биомассы и интенсивности эмиссии одного из штаммов, выделенных фотобактерий в стандартной богатой среде при 17°C.

Температурные оптимумы роста для выделенных штаммов 15–17°C. При указанных температурах стационарная фаза роста достигается через 20–24 часа, длительность стационарной фазы ~100–140 часов, длительность свечения (люминесцентный цикл) до 280 часов. Максимальная эмиссионная активность клеток наблюдается в поздней экспоненциальной фазе роста, удельная люминесцентная активность (10^4 – $5 \cdot 10^4$ квант/с.кл.) не изменяется в логарифмической фазе роста бактерий, что свидетельствует об отсутствии у данных штаммов фотобактерий явления аутоиндукции в процессе синтеза люциферазы *de novo*.

Влияние pH, NaCl и температуры.

Информация по солевой, pH и температурной зависимости биолюминесценции *in vivo* служат не только важными показателями видовых и штаммовых отличий, но и отражает адаптационные изменения физиологического состояния клетки в специфических условиях среды обитания.

Известно, что в ходе глубинного роста фотобактерий pH среды сдвигается в кислую область, за счет образования кислых продуктов метаболизма. Сдвиг pH прямо отражается на длительности и интенсивности люминесцентной активности популяции. Величина сдвига pH существенно отличается у разных видов и штаммов, наибольшая скорость образования кислот характерна для быстро растущих мезофильных фотобактерий *V. harveyi*, наименьшая у психрофильных *P. phosphoreum*. Нами установлено, что подкисление среды всеми выделенными штаммами протекало с низкой скоростью, – изменение pH среды не превышало 0,3 ед. pH, и происходило в логарифмической фазе роста. С переходом в стационарную фазу pH среды стабилизируется.

pH-зависимость свечения интактных клеток показала, что все штаммы имеют ярко выраженную алкалотолерантность. В диапазоне pH 7,5–9,0 биолюминесцентная активность на максимальном уровне. Можно полагать, что низкая скорость темнового энергетического метаболизма психрофильных бактерий является одним из основных факторов высокой стабильности люминесцентного цикла.

Люминесцентная активность проявляется в диапазоне концентраций NaCl 0,5–4%, с максимальными величинами при 2,5%. В 1% NaCl биолюминесцентная активность составляет ~20% от максимальной. При концентрациях ниже 0,5% и выше 4% соли происходит резкое подавление свечения клеток. Нижний порог

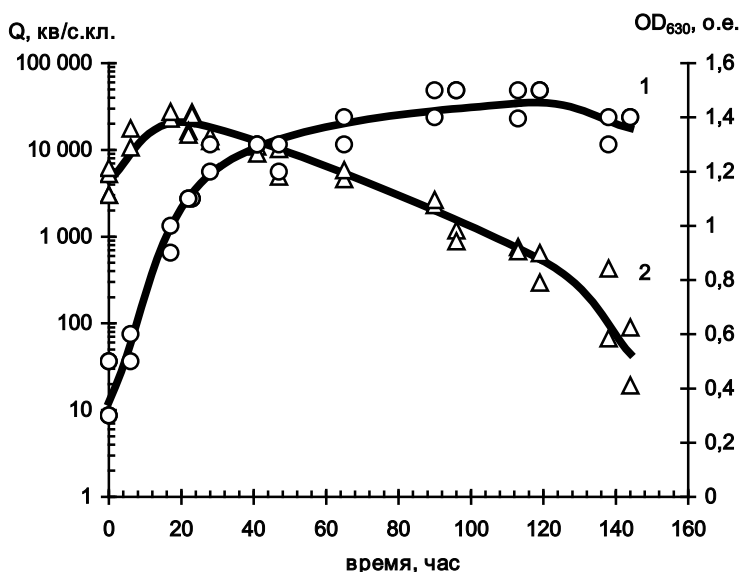


Рисунок 1. Накопление биомассы (кривая 1) и свечение (кривая 2) при культивировании фотобактерий на морской воде с добавлением пептона (5 г/л), дрожжевого экстракта (0,1 г/л) и глицерина (0,3%), pH 7,6, при температуре 17°C

солевой зависимости характерен для всех выделенных низкотемпературных штаммов, и также указывает на адаптационные особенности метаболизма бактерий к условиям Северных морей.

Литературный анализ по чувствительности фотобактерий к температурному воздействию *in vivo* свидетельствует, что интенсивность и стабильность свечения фотобактерий прежде всего обусловлена специфическими природными особенностями вида и штамма [6]. В значительной степени эмиссионная активность определяется эффективностью сопряжения NAD – зависимой электротранспортной системы с люциферазой. Принципиально, что величины темновых утечек в цепи по альтернативным путям, в сочетании с неферментативным автоокислением FMNH₂ индивидуальны для разных штаммов фотобактерий [7,8]. Кроме того, природа потери свечения при температурном воздействии однозначно не определена.

Природа потери свечения низкотемпературными штаммами фотобактерий при температурном воздействии неизвестна. Для психрофильных бактерий не представлены критические значения температурного эффекта (доза/время), способные вызывать образование темновых мутантов, обратимость или необратимость потери свечения. Считается, что наиболее «узким» звеном эмиссионной активности может быть сопряженность цепи переноса электронов на люциферазу [8].

Действие температуры на эмиссионную активность интактных клеток представлено на рисунке 2. Эксперименты на изолированных клетках ставили целью более четкого описания температурного профиля свечения. При этом учитывалось, что чувствительность изолированных клеток к температуре может отличаться от таковой для растущей культуры. Особое внимание уделено критическим значениям температуры, вызывающим полную или частичную потерю свечения и протекторным свойствам среды инкубации клеток.

Как было отмечено выше, протекторное действие на стабильность свечения оказывают ряд факторов, в том числе компоненты среды культивирования и pH среды инкубации. Соответственно анализ температурного воздействия проводился в соответствующих средах: солевом растворе, богатой среде для глубинного культивирования, и фосфатно-карбонатном буфере, pH 8,5.

На рисунке 2 показаны температурные профили свечения клеток в 2,5% NaCl и среде культивирования (СК). Температурные профили свечения для обоих случаев близки. Вместе с тем обнаружено, что температурный максимум свечения сдвинут к более высоким значениям (~ 20°C) по сравнению с оптимумом свечения растущей культурой (~15°C). Устойчивость к температурному воздействию проверялась путем инкубации клеток при различных температурах и времени, с последующим быстрым охлаждением до 4°C, и последующим измерением температурной зависимости. Установлено, что уже 15-минутная инкубация при 30°C в солевом растворе приводит к необратимой потере свечения. Среда культивирования оказывает протекторный эффект, однако увеличение времени температурного воздействия до 30 минут и в этих условиях приводят к необратимой потере свечения. Щелочная среда инкубации (0,1 М фосфатно-карбонатный буфер, pH 8,5) оказывает протекторное действие, сходное со средой культивирования.

Влияние температуры на временную кинетику свечения интактных клеток фотобактерий из логарифмической фазы роста представлено на рисунке 3.

Результаты свидетельствуют, что при температурах от 4°C до 15°C свечение стабильное в течении 4 часов времени наблюдения. Резкое изменение в кинетике затухания свечения происходит уже при температуре 22°C, при 30°C клетки полностью теряют свечение за 30 мин инкубации.

Как известно, оптимальная температура свечения и роста для *V. harveyi*, *V. fischeri* и *P. leiognathi* 25-30°C, в то время как психрофильные штаммы *P. phosphoreum* проявляют максимальную люминесцентную активность при температурах 15-20°C [1,3].

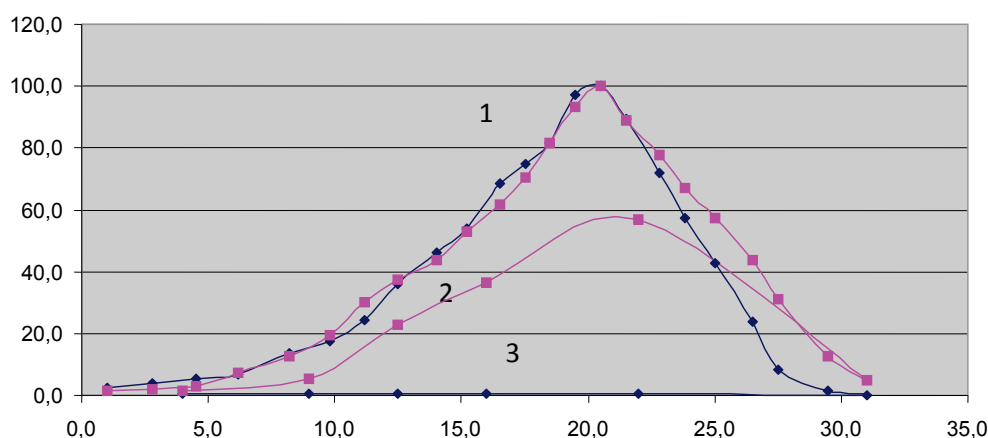


Рисунок 2. Температурные зависимости свечения в 2,5% NaCl (кривые 2,4), и среде культивирования (кривые 1,3). Кривые 3 и 4 получены после 15 мин инкубации при 30°C

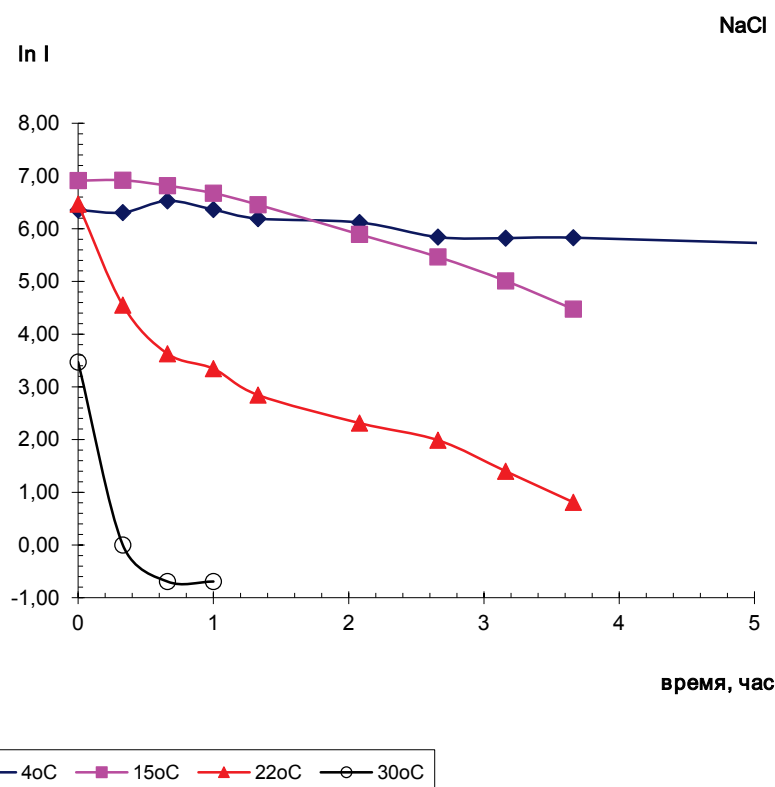


Рисунок 3. Кинетика затухания свечения клеток фотобактерий в 2,5 % NaCl при разных температурах

В то же время четкие данные о значениях обратимого и необратимого температурно-временной инактивации свечения для конкретных видов и штаммов фотобактерий отсутствуют. Результаты работы свидетельствуют в пользу предположения, что наиболее вероятным процессом потери свечения при температурах свыше 20°C для психрофильных видов является разобщение цепи процесса переноса электронов на люциферазу. Можно полагать, что фотобактерии из холодных морей Арктики обладают высокосопряженной системой переноса электронов на люциферазу, что проявляется в высокой люминесцентной активности клеток и повышенной длительности эмиссии. Наиболее важным свойством психрофильных фотобактерий арктических морей является повышенная, по сравнению с мезофильными удельная активность и стабильность свечения.

Совокупность данных также показывает доминирующую роль температуры среды обитания в адаптации энергетических и физиологических характеристик светящихся бактерий, и хорошо согласуются с данными по глубинному распределению видов фотобактерий [1-3].

Основные физиологические и биолюминесцентные характеристики фотобактерий из арктических морей представлены в таблице 1.

Высокая интенсивность и стабильность свечения, создает возможность практического применения данных штаммов как биосенсора [4] в люминесцентных тест-системах и применения бактериальных биосенсоров в дискретном и непрерывном режиме биотестирования загрязнителей окружающей среды.

Таблица 1

Максимум эмиссии	478-480нм
Температурный оптимум свечения	15-17° C
Удельная скорость роста в глубинной культуре	0,1-0,15 ч ⁻¹
Длительность люминесцентного цикла в глубинной культуре (15°C)	до 200 ч
Оптимум и диапазон pH свечения	8,5; 7,0 – 9,0
Оптимум и диапазон NaCl	2,2; 0,5 – 4,0
Максимальная удельная активность <i>in vivo</i>	10 ⁵ квант/с·кл,
Температурный диапазон свечения	4-25°C

Список литературы / References:

1. Nealson K.H., Hastings J.W. Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. *Microbiology Reviews*, 1979, vol. 43, no. 4, pp. 406-518.
2. Nealson K.H. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in the nearshore seawater. *Luminology and Oceanography*, 1978, vol. 23, pp. 164-169.
3. Kuts V., Ismailov A.D. Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea. *Microbiology*, 2009, vol. 78, no. 5, pp. 554-558.
4. Ismailov A.D., Aleskerova L.E., Alenina K.A., Efremenko E.N. Biosensors using free and immobilized cells of luminous bacteria. Bioluminescence. *Analytical Applications and Basic biology*, 2019, pp. 43-57.
5. Hastings J.W., Weber G. Total quantum flux of isotropic sources. *Journal of the Optical Society of America*, 1963, vol. 53, no. 12, pp. 1410-1415.
6. Cline T.W. Isolation and characterization of luminescence system mutants in bacteria. *Methods in Enzymology*, 1978, vol. 57, pp. 166-171.
7. Waters P., Lloyd D. Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analyzed on gradient plates. *Journal of General Microbiology*, 1985, vol. 11, pp. 2865-2869.
8. Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. The cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 1970, vol. 104, no. 3, pp. 313-322.

ECOLOGICAL FEATURES OF MARINE LUMINOUS BACTERIA FROM THE ARCTIC REGION**Alenina K.A., Aleskerova L.E., Ismailov A.D.**

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 1, bld. 12, Moscow, Russia; e-mail: anvaris@list.ru

Abstract. The physiological and emission characteristics of new symbiotic luminous bacteria isolated from the fishes in the White, Bering and Okhotsk seas have been studied. It was found that all isolated strains, regardless of the mode of existence and habitats, belong to the group of psychrophilic photobacteria *Photobacterium phosphoreum*. All strains are distinguished by highly stable bioluminescence during submerged cultivation in the temperature range of 4-20 °C. The most important factors determining the emission activity and luminescence stability of intact photobacteria cells have been identified. It has been shown that the most critical factor for luminescence is the temperature value of bacterial cultivation and incubation.

Key words: photobacteria, bioluminescence, *Photobacterium phosphoreum*.

ЧАСТОТНО-ВРЕМЕННОЙ АНАЛИЗ ПОДВОДНЫХ ЗВУКОВ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ЗУБАТЫЕ КИТЫ

Лисиутин В.А., Ластовенко О.Р., Дегтяр А.Д. Ярошенко А.А., Петренко Н.В.,
Лучин В.Л., Рыбакова К.А., Мирошниченко Е.В.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 03.08.2020

Аннотация. Изучение подводных звуков, издаваемых зубатыми китами востребовано с точки зрения экологии, подводной навигации, военных применений. Механизмы излучения и приема звуков зубатыми китами представляют собой наиболее сложные проблемы биоакустики. Изучение, анализ и систематизация звуков китообразных может дать возможность идентификации вида и количества особей. С другой стороны, зубатые киты являются излучателями самых высокочастотных звуков со сложными видами модуляции. Если известно расположение источника и приемника, частотно-временной анализ звукового поля может быть использован для инверсии акустических свойств волновода. В работе приводится обзор видов морских млекопитающих – зубатых китов и издаваемых типов высокочастотных 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 высокочастотных звуков млекопитающих для решения задач инверсии акустических свойств волновода.

Ключевые слова: звуки морских млекопитающих, частотно-временной анализ, многолучевой характер распространения.

Введение.

Изучение подводных звуков, издаваемых зубатыми китами (дельфинами) востребовано с точки зрения экологии, подводной навигации, военных применений. Возможности биологической мимикрии, когда продолжительные сигналы используются для синхронизации канала связи, а импульсные – для передачи битов информации может использоваться для создания скрытого канала связи, имеющего низкую вероятность обнаружения и перехвата. Идея акустической мимикрии заключается в разработке такого вида модуляции информационного сигнала, который имитирует естественные звуковые ландшафты подводной среды. Механизмы излучения и приема звуков зубатыми китами представляют собой наиболее сложные проблемы биоакустики [1-7]. Известно, что дельфины распознают цели на основании одного короткого эхо-сигнала, не используя принципа накопления. Излучающая система зубатых китов способна варьировать интенсивность, частоту, длительность зондирующих импульсов в широких пределах.

Данная статья является обзорной, в значительной степени основанной на анализе открытых иностранных источников. Записи звуков взяты в основном с сайта [8].

Зубатые Киты (Toothed Whales).

На рисунке 1 показаны китообразные: 1 – Обыкновенный дельфин, короткоклювый обыкновенный дельфин (*Delphinus delphis*—**Common Dolphin, Short-beaked Common Dolphin**); 2 – Карликовая касатка (*Feresa attenuata*—**Pygmy Killer Whale**); 3 – Тропическая гринда (*Globicephala macrorhynchus*—**Short-Finned Pilot Whale**); 4 – Обыкновенная гринда (*Globicephala melas*—**Long-Finned Pilot Whale**); 5 – Австралийский курносый дельфин (*Orcaella heinsohni*—**Australian Snubfin Dolphin**); 6 – Касатка (*Orcinus orca*—**Killer Whale**); 7 – Малая, или черная касатка (*Pseudorca crassidens*—**False Killer Whale**); 8 – Вертящийся продельфин, или длиннорылый продельфин (*Stenella longirostris*—**Long-Snouted Spinner Dolphin**); 9 – Индийская афалина, пятнистая афалина (*Tursiops aduncus*—**Indian Ocean Bottlenose Dolphin, Spotted Bottlenose Dolphin**); 10 – Афалина (*Tursiops truncatus*—**Bottlenose Dolphin**); 11 – Кашалот (*Physeter macrocephalus*—**Sperm Whale**).

Обыкновенный дельфин, короткоклювый обыкновенный дельфин (*Delphinus delphis*—**Common Dolphin, Short-beaked Common Dolphin**). Самый распространенный вид семейства дельфиновых. Длина тела около 160-260 см, но в Черном море не превышает 210 см, при этом вес достигает 110 кг. Дельфины очень стройные, с длинным клювом, резко отграниченным от жировой подушки бороздками. На небе 2 глубоких продольных желоба. Зубы острые, многочисленные, вверху и внизу по 40-50 пар (всего 160-200 штук), толщиной 2-3 мм.

Карликовая касатка (*Feresa attenuata*—**Pygmy Killer Whale**). Внешностью они напоминают черных касаток в миниатюре. В длину достигают 2,5 метра, а вес – до 170 кг. Голова их относительно маленькая, спереди закругленная, без клюва, с небольшим ртом. Спинной плавник 20-30 см высотой, треугольной формы, неглубоко вырезан по заднему краю. Зубы крепкие, наверху 8-12 пар, внизу 10-13 пар, диаметром у десны 6-7 мм, в корне 10 мм.

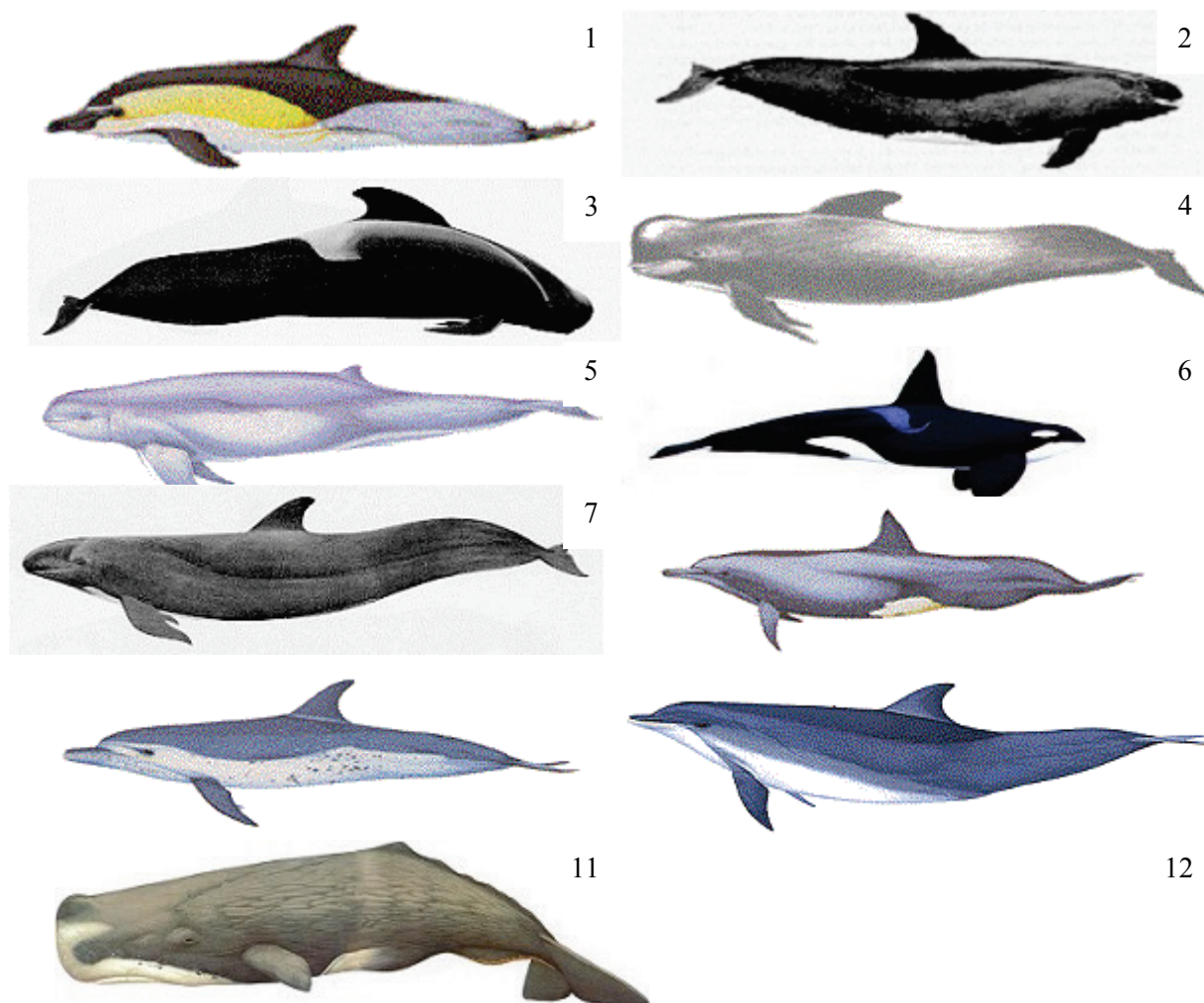


Рисунок 1. Зубатые киты

Тропическая гринда (*Globicephala macrorhynchus*—**Short-Finned Pilot Whale**). Длина взрослой особи – 3,6-6,5 метров, вес – от 1 до 4 тонн. Имеет всего 6-8 зубов в каждом ряду. Отличается самыми короткими в роде грудными плавниками (около 1/6 длины тела или даже еще короче). Биология изучена слабо.

Обыкновенная гринда (*Globicephala melas*—**Long-Finned Pilot Whale**). Взрослые особи достигают 6 метров в длину при весе 3,5 тонны. Почти вся черная, но на брюхе есть белый рисунок в виде якоря. Изредка может быть светлое заглазничное пятно и седло позади спинного плавника. Грудные плавники от 1/4 до 1/5 длины тела. Имеет 8-11 пар зубов сверху и 9-12 пар внизу.

Австралийский курносый дельфин (*Orcaella heinsohni*—**Australian Snubfin Dolphin**). Шарообразно закругленная спереди голова короткая и широкая. Умеренно длинные грудные плавники расширены у основания. Спинной плавник серповидно вырезан на заднем крае. Общая окраска тела шиферно-серая, снизу несколько светлее. В длину достигают 2,6 метра при весе до 150 кг. По 12-14 зубов в каждом ряду, толщиной 0,5 мм.

Касатка (*Orcinus orca*—**Killer Whale**). Крупнейшие и очень проворные плотоядные дельфины. Вес взрослого – 2,6-9 т. Длина взрослой особи-самки до 8,7 м (с числом дентиновых слоев на зубах до 29), самцы до 10 м. Голова умеренной величины, широкая, сверху слегка уплощенная, снабжена мощными жевательными мышцами, обеспечивающими крайне сильный прикус. Лобно-носовая подушка низкая, клюв не выражен. Все плавники сильно увеличены, в особенности спинной. Зубы массивные, по 10-13 пар сверху и внизу, уплощены спереди назад.

Малая, или черная касатка (*Pseudorca crassidens*—**False Killer Whale**). Малая касатка сугубо стадный вид. Очень крупные, стройные, сплошь темные, почти черные, дельфины. Длина взрослого – самки до 5 м, самцы до 6 м. Вес взрослого – до 1360 кг. Голова небольшая, сверху уплощенная, спереди тупо закруглена, без клюва. Грудные плавники узкие и заостренные. Спинной плавник глубоко вырезан. Зубы крепкие, по 8-12 пар сверху и внизу, толщиной до 27 мм.

Вертящийся продельфин, или длиннорылый продельфин (*Stenella longirostris*—**Long-Snouted Spinner Dolphin**). Славится как отличный прыгун: в воздухе, пока летит, он успевает 2-3 раза (до 7) повернуться вокруг своей оси, за что и получил название "вертящийся". Длина достигает 2,1 метра, вес достигает 75 кг. Спинной плавник треугольный или слегка изогнутый, наклонен вперед. Основание хвоста у взрослых самцов выпуклое сверху и снизу. Вверху и внизу по 52 пары зубов. Иногда к зубам прикрепляются грозди усонюгих раков из рода конходермы.

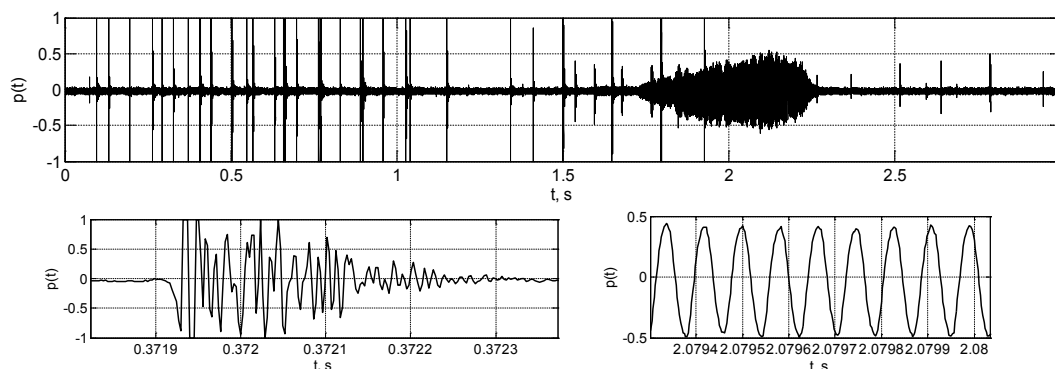


Рисунок 2. Панорама реализации звука обыкновенного дельфина (верхняя панель) и детализация импульсного и тонального звука

Индийская афалина, пятнистая афалина (*Tursiops aduncus*—**Indian Ocean Bottlenose Dolphin, Spotted Bottlenose Dolphin**). Индийская афалина очень похожа на обычную афалину по внешнему виду. Этот дельфин вырастает до 2,6 м в длину, а вес до 230 кг. Она также имеет от 23 до 29 зубов на каждой стороне каждой челюсти

Афалина (*Tursiops truncatus*—**Bottlenose Dolphin**). Афалина изучена лучше и полнее всякого другого вида дельфинов. Умеренно развитый клюв четко ограничен от выпуклой лобно-носовой (жировой) подушки. Череп достигает в длину 58 см. Нёбо плоское, без боковых желобов. Спинной плавник высокий, на широком основании, сзади полулунно вырезан. Грудные плавники у основания широкие, к концу заостряются, по переднему краю выпуклые, а по тонкому заднему вогнутые. Длина взрослого - дельфина средней величины: 1,9-3 м, редко до 3,6 м длиной. Самцы на 10-20 см больше самок. Вес взрослого - 150-400 кг. Зубы крепкие, конически заостренные, 6-10 мм толщиной, 19-28 пар вверх (40-52) и на 1-3 пары меньше вниз (36-48).

Кашалот (*Physeter macrocephalus*—**Sperm Whale**). Это крупнейший зубатый кит. Взрослые особи размером 18 м весят до 50 тонн. Огромная, притупленная спереди и сдавленная с боков голова составляет 1/4-1/3 часть всей длины тела; у самцов она крупнее, чем у самок. Спинной плавник имеет вид толстого и низкого горба, за ним еще несколько (2-6) горбов поменьше. Грудные плавники широкие и тупо закругленные. На нижней челюсти 18-30 пар колышковидных зубов без эмали, достигающих 27 см в длину. Крупнейшие зубы достигают почти 1,6 кг.

Частотно-временной анализ звуков.

Обыкновенный дельфин, короткоклювый обыкновенный дельфин (*Delphinus delphis*—**Common Dolphin, Short-beaked Common Dolphin**). Свистки имеют частоту от 3 до 24 кГц и продолжительность 0,01-4 с. Также слышен импульсный звук на частоте 2-14 кГц длительностью 0,5-0,75 с. Пик щелчков находится в диапазоне между 23 и 67 кГц и имеют полосу частот 17-45 кГц, они длятся 50-150 мкс. Панорама реализации показана на рисунке 2.

Как видно на панораме реализации, звук состоит из коротких импульсных посылок и длительного тонального звука – свиста с частотой 10 кГц. Звук записан специализированной аппаратурой с частотой дискретизации 384 кГц и прослушать его с помощью обыкновенной звуковой карты компьютера невозможно.

Карликовая касатка (*Feresa attenuata*—**Pygmy Killer Whale**). Спектральные характеристики их щелчков (10-150 кГц, 25 мкс, 197-223 дБ/1мкПа) были записаны в северной части Индийского океана. Свист имеет несущую частоту свыше 5 кГц, часто достигает пика около 10 кГц и длится 0,3-0,8 с. Импульсные звуки с всплеском имеют частоту выше 3 кГц до частоты Найквиста, и обычно длится 1-3,5 с. Панорама реализации сигнала и спектрограмма приведены на рисунке 3. Как видно, сравнивая рисунки 2 и 3, импульсные звуки дельфина и касатки очень похожи. Тональный свист имеет частоту 10 кГц и явно видную вторую гармонику (в отличие от тонального свиста дельфина – там синусоида очень чистая). На слух (здесь частота дискретизации 48 кГц) звуки воспринимаются буквально как свист очень высокой частоты и на его фоне громкие щелчки типа электрических высоковольтных разрядов.

Тропическая гринда (*Globicephala macrorhynchus*—**Short-Finned Pilot Whale**). Излучают свистки с основными частотами от 1 до 20 кГц и длительностью 0,1- 5 с. Импульсные звуки охватывают полосу частот от 1 до более 30 кГц, длительностью до 1,5 с. Тропические гринды используют бифонации, то есть одновременное испускание двух вокализаций одной и той же особью. Щелчки и жужжание при поиске пищи во время глубокого погружения были зарегистрированы с пиковой частотой 8-39 кГц и 0,2-1,2 мс на щелчок. Также этот вид копирует тональные звуки антропогенных источников (например, среднечастотный сонар). Пример копирования сонара и на фоне тонального звука щелчки – на рисунке 4.

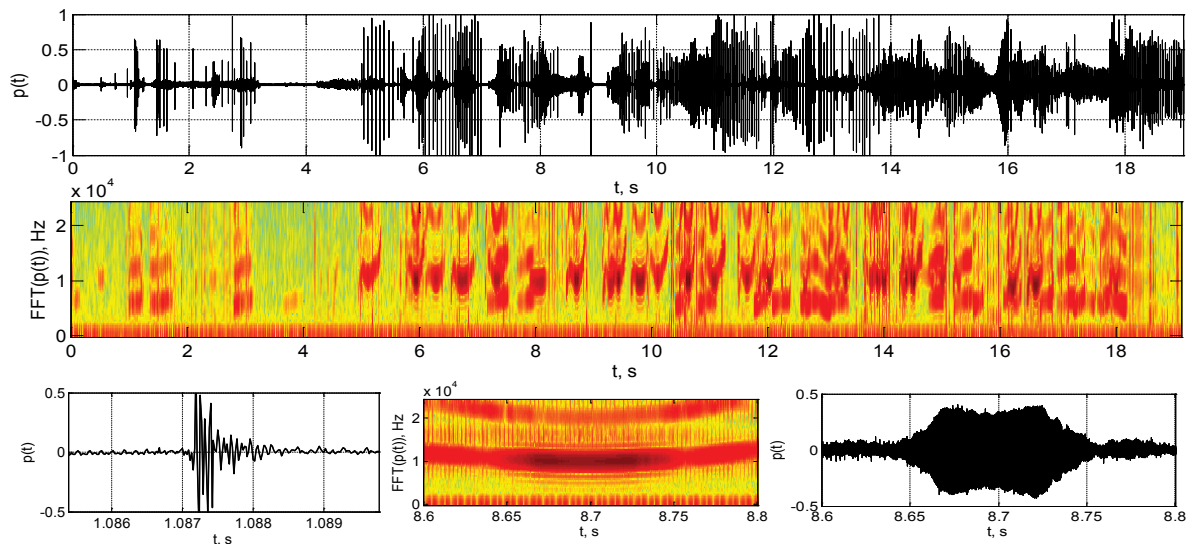


Рисунок 3. Панорама реализации спектрограмма звука карликовой касатки (верхняя панель) и детализация импульсного и тонального звука

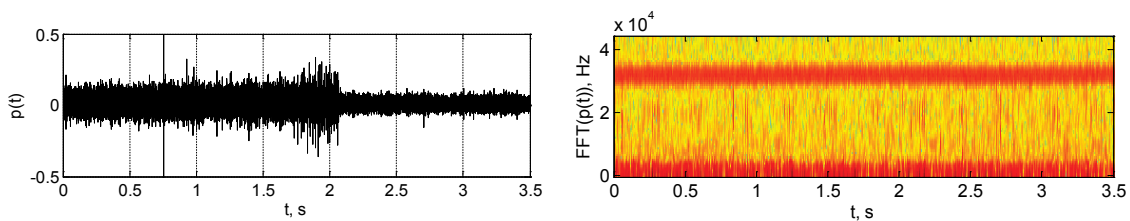


Рисунок 4. Тропическая гринда имитирует тональный сонар. Частота 32 кГц

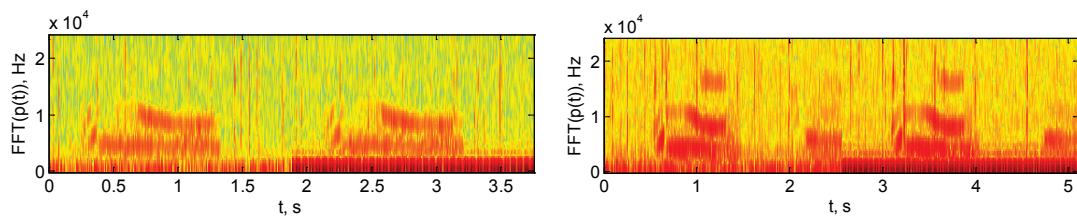


Рисунок 5. Обыкновенная гринда свистит

Обыкновенная гринда (*Globicephala melas*—**Long-Finned Pilot Whale**). В Средиземноморье, на востоке США и в Канаде, а также на северо-западе Атлантики этот вид свистит между 1 и 11 кГц продолжительностью 0,1-3 с. Тональные сигналы издавались в диапазоне 1-8 кГц у берегов Ньюфаундленда. Импульсы всплеска охватывают более широкую полосу (100-22000 Гц) и длительностью 0,1-2,2 с. Также используют бифонации. Ритмичные повторяющиеся последовательности вызовов способствуют социальному поведению. На рисунке 5 приведены две спектрограммы с бифонациями, на слух воспринимаемыми как сверление скоростной бормашинной твердого зуба, когда возрастает прижатие сверла к зубу (понижается частота). Включающийся во второй половине спектрограммы низкочастотный фон – вероятно помеха.

Австралийский курносый дельфин (*Orcaella heinsohni*—**Australian Snubfin Dolphin**). Свистки имеют частоту в диапазоне от 600 Гц до 13 кГц и длятся 0,1–0,45 с. Импульсные звуки колеблются от 1 до более чем 22 кГц и длятся 4 ± 2 с. Последовательности щелчков охватывают диапазон от 300 Гц до более чем 22 кГц, длятся 0,1–20 с и имеют 10-46 щелчков/с. Гудения имеют до 116 щелчков/с. Панорама звука и две детализации приведены на рисунке 6.

Временная структура щелчков удивительно напоминает лучевую структуру единственного импульса, распространяющегося вдоль оси подводного звукового канала. Действительно, импульс состоит из «четверок» – четырех вступлений лучей, имеющих очень близкое, но немного разное время пробега [9]. Изменение очередности вступлений, появление эха может быть объяснено движением излучающего объекта в волноводе, при котором изменяется его глубина относительно оси звукового канала.

Касатка (*Orcinus orca*—**Killer Whale**). Касатки издают частотно модулированные звуки (свистки) переменной длительности (0,06–18,3 с) с частотным диапазоном 1-30 кГц. Редкие низкочастотные FM-звуки с основной частотой 50-270 Гц длительностью 0,1-2,8 с были получены из Исландии. Касатки также производят

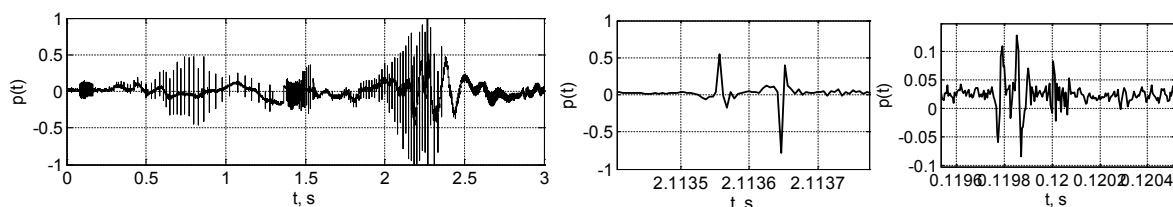


Рисунок 6. Панорама звука и детализации щелчков австралийского дельфина.

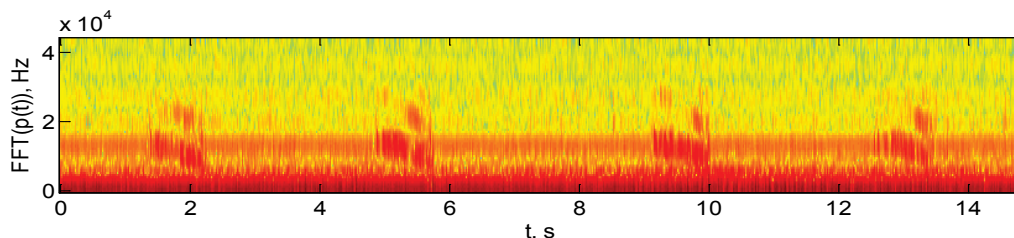


Рисунок 7. Спектрограмма звука черной касатки

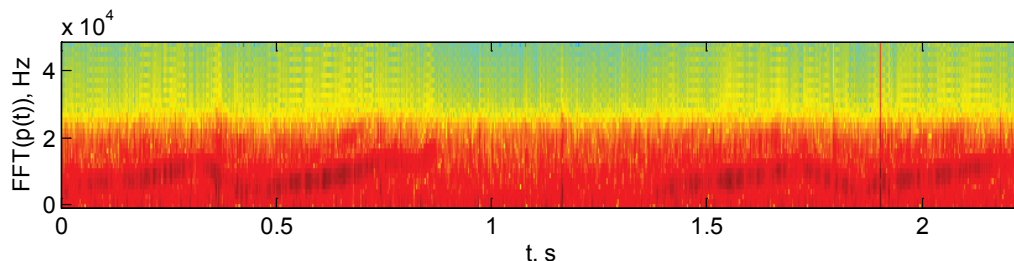


Рисунок 8. Спектрограмма звука индийской афалины

высокочастотные FM-звуки с частотой 16-75 кГц и уровнем источника 185-193 дБ. Тональные звуки редки (3-5 кГц, $0,37 \pm 0,08$ с). Их эхолокационные щелчки охватывают диапазон 10-110 кГц, 100-250 мкс, в последовательностях 3-7 с, на уровнях громкости 107-224 дБ.

Малая, или черная касатка (*Pseudorca crassidens*—**False Killer Whale**). Используют свистки на частоте 5-8 кГц длительностью 0,2-0,8 с. Их импульсные звуки состоят из серии быстрых импульсов синусоидальных сигналов, обычно в ускоряющейся последовательности импульсов. Импульсные звуки охватывают полосу 0,5-22 кГц и длятся 0,05-1 с. Иногда издают бимодальные щелчки, которые имеют два пика частоты, один из которых составляет около 40 кГц, а другой – около 100 кГц. Длительность щелчка колеблется от 18 до 530 мкс. На рисунке 7 приведена спектрограмма звуков черной касатки с негативной линейной частотной модуляцией.

Вертящийся продельфин, или длиннорылый продельфин (*Stenella longirostris*—**Long-Snouted Spinner Dolphin**). Этот вид издает звуки CW, но они постоянно смешиваются со звуками FM во время анализа. Свистки варьируются от 2 до 23 кГц и длятся от 0,1 до 1,8 с. Импульсные звуки охватывают полосу частот 220 Гц-130 кГц, длятся 0,05-2 с. Может быть 30 импульсов/цикл с длительностью 3,85 мс. Щелчки охватывают 20-130 кГц, длятся 0,2-0,4 мс с длительностью 121-235 мс.

Индийская афалина, пятнистая афалина (*Tursiops aduncus*—**Indian Ocean Bottlenose Dolphin, Spotted Bottlenose Dolphin**). Большинство исследований было проведено на свистках, которые варьируются по частоте от 1 до 22 кГц и по длительности от 0,1 до 5,9 с. Звуки тональные в основном объединены с частотно-модулированными, и поэтому их параметры не всегда различимы. Эхолокационные щелчки охватывают полосу частот от 45 до 109 кГц с пиковой частотой 124 ± 13 кГц, последние 18 ± 6 мкс, с интервалами между щелчками 63 ± 45 мс и исходными уровнями 205 ± 7 дБ. Спектрограмма показана на рисунке 8.

Если судить по спектрограмме, то наблюдаемые звуки имеют вид модулированных по частоте сначала по возрастающему закону, затем по убывающему и наоборот. Субъективно воспринимается как звук сирены детского автомобиля скорой помощи.

Афалина (*Tursiops truncatus*—**Bottlenose Dolphin**). Звуки обычно объединяются со свистками и называются “плоскими” свистками. Тональные и модулированные по частоте звуки звучат вместе в диапазоне частоты от 300 Гц до 39 кГц и от 40 мс до 4 с с длительностью, с уровнем громкости 114-163 дБ. Частотно-модулированный звучит на более низкой частоте, иногда описывается отдельно и называется “низкочастотным узкополосным” звучит с частотой 30 Гц–1 кГц и длительностью 10 мс – 8,7 с. Импульсные звуки колеблются от нескольких кГц до более чем 150 кГц, длятся 0,1-4 с, со 150-1050 импульсами/с и уровнями громкости около 195 дБ. Эхолокационные

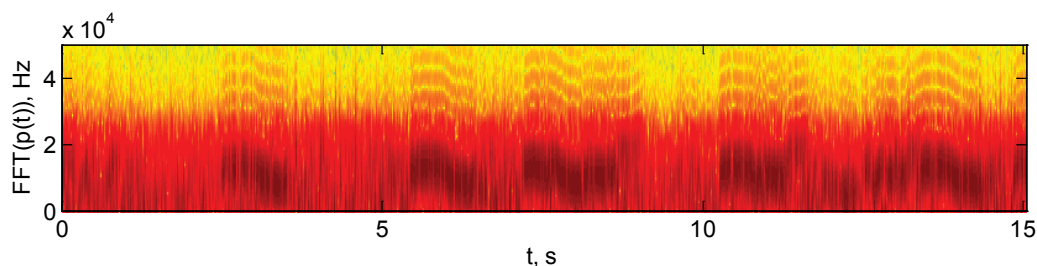


Рисунок 9. Спектрограмма звука афалины

щелчки колеблются от 20 до 150 кГц, достигая максимума между 50 и 110 кГц. Щелчки длятся 10-80 мкс с интервалами между щелчками 20-180 мс, $11,4 \pm 1,6$ кликов/цикл. Спектрограмма – на рисунке 9, где видно аналогичное рисунку 8 изменение частоты вверх-вниз

Кашалот (*Physeter macrocephalus*—**Sperm Whale**). Клики кашалотов теперь обычно классифицируются на пять классов в соответствии с их временной структурой:

1. "Писк" с частотой до 1600 кликов/с,
2. "Скрипы" с частотой до 220 щелчков/с,
3. "Обычные щелчки" с интервалами между щелчками около 0,5-1 с, и
4. "Медленные клики" (иногда называемые "одиночными кликами") с длительными интервалами между кликами 3-8 с.

5. Социализирующиеся группы выделяют стереотипные последовательности щелчков (паттерны), называемые "кодами", продолжительностью до нескольких часов.

Клики имеют полосу пропускания 100 Гц-30 кГц, с пиковой частотой около 15 кГц. Длительность щелчка составляет 0,2-3 мс. каждый щелчок может состоять из нескольких импульсов, а время между импульсами коррелирует с размером кашалота (головы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Звуки, издаваемые зубатыми китами достаточно разнообразны и отражают условия существования в разнообразных условиях окружающей среды. Щелчки могут издаваться часто либо редко, в зависимости, вероятно от времени задержки выслушиваемого отклика. По-видимому, щелчки издаются поодиночке, их запись «четверками» обусловлена многолучевым характером распространения. Частотно-модулированные свисты отражают попытки «согласовать» параметры сигнала с окружающей средой, т.е. с законом дисперсии волновода мелкого или глубокого моря, в котором и обитает млекопитающее. Отметим, что закон дисперсии волновода мелкого моря определяется акустическими свойствами его дна [10-12]. Обращает внимание, что используется как позитивная (возрастание частоты), так и негативная (понижение частоты) частотная модуляция свиста.

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. Романенко Е.В. Акустика дельфинов и рыб. *Акустический журнал*, 2019, т. 65, № 1, с. 82-92. [Romanenko E.V. Acoustics of Dolphins and Fish (Review). *Acoustical Physics*, 2019, vol. 65, no. 1, pp. 103-112. (In Russ.)]
3. Рутенко А.Н., Вишняков А.А. Временные последовательности гидроакустических сигналов, генерируемые белухой при поиске и лоцировании подводных объектов. *Акустический журнал*, 2006, т. 52, № 3, с. 375-384. [Rutenko A.N., Vishnyakov A.A. Time sequences of sonar signals generated by a beluga whale when locating underwater objects. *Acoustical Physics*, 2006, vol. 52, no. 3, pp. 314-323. (In Russ.)]
4. Дубровский Н.А., Урусовский И.А., Гладиллин А.В. Модель генерации щелчков дельфина по типу антенны бегущей волны. *Акустический журнал*, 2009, т. 55, № 3, с. 423-430. [Dubrovsky N.A., Urusovskii I.A. Gladilin. A.V. A model of acoustic click production in the dolphin by analogy with a traveling-wave antenna. *Acoustical Physics*, 2009, vol. 55, no. 3, pp. 441-447. (In Russ.)]
5. Рябов В.А. Некоторые аспекты отражения ЧМ-сигналов (свистов) дельфинов в экспериментальном бассейне. *Акустический журнал*, 2019, т. 65, № 6, с. 853-860. [Ryabov V.A. Some Aspects of Reflection of Dolphin FM Signals (Whistles) in an Experimental Tank. *Acoustical Physics*, 2019, vol. 65, no. 6, pp. 771-777. (In Russ.)]
6. Сухорученко М.Н. Поведенческие исследования слухового различения дельфином пар импульсов-щелчков с одинаковым межимпульсным интервалом. *Акустический журнал*, 2008, т. 54, № 6, с. 1003-1008. [Sukhoruchenko M.N. Behavioral studies of the auditory discrimination of paired pulses with identical pulse spacings by a dolphin. *Acoustical Physics*, 2008, vol. 54, no. 6, pp. 874-879. (In Russ.)]

7. Иванов М.П. Эхолокационные сигналы дельфина при обнаружении объектов в сложных акустических условиях. *Акустический журнал*, 2004, т. 50, № 4, с. 550-561. [Ivanov M.P. Dolphin's echolocation signals in a complicated acoustic environment. *Acoustical Physics*, 2004, vol. 50, no. 4, pp. 469-479. (In Russ.)]
8. <https://cmst.curtin.edu.au/research/marine-mammal-bioacoustics> (date of assess 28.07.2020)
9. Лисютин В.А., Ластовенко О.Р., Ярошенко А.А. Сравнительная оценка вклада лучевых и волновых компонент при распространении импульсных сигналов в подводном звуковом канале Черного моря. *Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества*, 2018, т. 15, № 2, с. 74-85. [Lisiutin V.A., Lastovenko O.R., Yaroshenko A.A. The Comparative Evaluation of the Ray and Wave Components Contribution to the Impulse Signals Propagation of the Black Sea Underwater Sound Channel. *Ecological Bulletin of Research Centers of the Black Sea Economic Cooperation*, 2018, vol. 15, no. 2, pp. 74-85. DOI: 10.31429/vestnik-15-2-74-85 (In Russ.)]
10. 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*, [e-journal] 2018, vol. 15, no. 3, pp. 39-51. DOI: 10.31429/vestnik-15-3-39-51. (In Russ.)]
11. 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, no. 1, pp. 77-91. DOI: 10.22449/1573-160X-2019-1-77-91. (In Russ.)]
12. 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.)]

FREQUENCY-TIME ANALYSIS OF UNDERWATER SOUNDS OF MARINE MAMMALS. TOOTHED WHALES

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 study of underwater sounds emitted by toothed whales is in demand from the point of view of ecology, underwater navigation, and military applications. Mechanisms of radiation and reception of sounds by toothed whales are the most complex problems of bioacoustics. The study, analysis, and systematization of cetacean sounds can make it possible to identify the species and number of individuals. On the other hand, toothed whales are emitters of the highest frequency sounds with complex types of modulation. 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 waveguide. The paper provides an overview of the species of marine mammals – toothed whales and radiated types of high-frequency sounds. 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 high-frequency mammalian sounds to solve problems of inversion of acoustic properties of a waveguide.

Key words: marine mammal sounds, time-frequency analysis, multipath propagation.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ СУДОВЫХ ПОКРЫТИЙ, ОБОГАЩЕННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ

Мосунов А.А.¹, Евстигнеев В.П.¹, Сизова О.С.^{1,2}, Лернер М.И.³

¹ Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: aamosunov@sevsu.ru

² Институт природно-технических систем,
ул. Ленина, 28, г. Севастополь, 299011, РФ

³ Институт физики прочности и материаловедения СО РАН
пр. Академический, 8/2, г. Томск, 634055, РФ

Поступила в редакцию: 06.08.2020

Аннотация. В работе рассматривается спектрометрическая методика оценки устойчивости противообрастающих покрытий, содержащих наночастицы различных металлов, к биодеградации. Существуют основания полагать, что данный вариант биоцидного состава обладает пониженной токсичностью в сравнении с традиционными составами. Эффективность использованных в работе наночастиц показана ранее на модельных микроорганизмах. Дано краткое описание текущего состояния проблемы создания различных противообрастающих покрытий, указана перспективность использования покрытия, модифицированного наночастицами металлов. Описана методика проведения эксперимента по определению эффективности исследуемых покрытий на морских организмах *in vivo*. Во время исследований методами оптической и лазерной конфокальной сканирующей микроскопии, комбинационной и инфракрасной спектроскопии изучено состояние покрытия до его погружения в водную среду, а также после месяца экспонирования на специализированном полигоне в Севастопольской бухте. Проведено сравнение полученных спектров, а также спектров «контрольных» образцов (без наночастиц) со спектрами «рабочих» покрытий. Показано, что на первом этапе исследований не было обнаружено ярко выраженных изменений в состоянии органической матрицы покрытия.

Ключевые слова: наночастицы, комбинационная спектроскопия, инфракрасная спектроскопия, противообрастающие покрытия.

ВВЕДЕНИЕ

Морское биообрастание судов и гидротехнических сооружений является мировой проблемой, которая до сих пор эффективно не решена. Защита подводной части судов от морского обрастания является одной из актуальных задач современного судоремонта. Важность этой проблемы, в основном, определяется экономическими показателями доставки грузов судами и продолжительностью эксплуатации гидротехнических сооружений. Менее чем за шесть месяцев пребывания в море поверхность, не защищенная противообрастающими средствами, может собрать до 150 кг биозагрязнений на квадратный метр. Биообрастание судов приводит к снижению их ходовых качеств и повышенному расходу топлива.

В отечественном и зарубежном судостроении и судоремонте для защиты подводной поверхности различных плавсредств, морских платформ для газо- и нефтедобычи, доков используются многослойные защитные покрытия [1]. Противообрастающий состав (краска, эмаль) поверхностного слоя такого покрытия защищает окрашенную поверхность от оседания гидробионтов-обрастателей, оказывая отравляющее действие на расселительные, ювенильные и даже взрослые их формы [2].

Основной механизм защитного действия противообрастающих красок – выделение (выщелачивание) токсичных или репеллентных соединений. В качестве таких соединений используются соединения меди (в основном закись меди), металлоорганические соединения олова, мышьяка, кобальта, никеля, цинка, ртути, природные органические соединения, обладающие репеллентным, наркотирующим действием на личинки обрастателей [2] и современные альтернативные безбиоцидные компоненты [3, 4].

Вместе с тем, используемые покрытия по экологической безопасности и эффективности не отвечают всем запросам практики. Биоциды оказывают значительное побочное влияние на «нецелевые», сопутствующие морские организмы [5]. Кроме того, противообрастающие краски выделяют соединения тяжелых металлов, что, очевидно, загрязняет морскую среду особенно в районах стоянки судов [6].

На сегодняшний день основным трендом развития мировой науки в этом направлении является разработка новых, менее токсичных, но эффективных покрытий, основанных на применении наночастиц биологически активных металлов и их оксидов [7].

Как показала серия работ, выполненная специалистами Института физики прочности и материаловедения СО РАН, повышенная антибактериальная активность, по сравнению с простыми оксидами и индивидуальными металлами, наблюдается у бикомпонентных наночастиц и их оксидов. Такие наночастицы содержат два несмешивающихся компонента на уровне отдельных наночастиц. Например, это пары, Al-Zn, CuO-ZnO, Ag-CuO, Ag-ZnO, ZnO-FeZnO, Ag-TiO₂, CuO-(FeCu)O. В институте была проведена серия экспериментов по выявлению оптимального содержания биоактивных компонентов в наночастицах с точки зрения токсичности по отношению

к живым клеткам. Потенциально эти же группы наночастиц могут быть использованы в качестве ключевого компонента противообрастающих покрытий.

Для оценки потенциала использования таких групп наночастиц в качестве биоцида в противообрастающем составе требуется адаптация существующей методологии оценки эффективности экспериментальных образцов. В частности, одним из важнейших элементов методологии является методика определения степени разрушения органической основы матрицы противообрастающего состава под действием морской воды и биодеструкции перифитонными микроорганизмами. В качестве таковой чаще всего рассматриваются спектрометрические методы.

Целью настоящей работы являлась апробация методов комбинационной и инфракрасной спектроскопии для оценки изменений в органической основе матрицы, содержащей бикомпонентные наночастицы оксидов металлов, при экспонировании образцов в естественных условиях морской среды. В работе использованы однокомпонентные наночастицы оксидов металлов ZnO, CuO и бикомпонентные – (Fe-Zn)O, (Fe-Cu)O.

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Бикомпонентные наноконпозиции, предварительно подготовленные в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН, смешивались со связующими веществами для формирования матрицы покрытия. Использовались два варианта связующих веществ – на основе полиметилметакрилата (оргстекло, биологически инертный материал, применяется как добавка в краски) и эпоксидной смолы. В состав покрытий пластин вводились следующие концентрации: 10 вес %, 5 вес. % и 3 вес. % каждого из нанопорошков. В предыдущих исследованиях [8] было показано, что при 5 вес. % отмечается полное подавление жизнедеятельности микроорганизмов в течение 6-24 часов на всех порошках.

После покрытия стальных пластин составом экспериментальные образцы выставлялись на экспонирование в бухте Старосеверной, – одна из бухт на Северной стороне города Севастополя. Испытуемые образцы подвешивали на морском испытательном стенде (пирсе) и опускали на глубину 2,5 м при общей глубине моря в месте размещения – 5 м. С периодичностью раз в две недели проводилась качественная и количественная оценка состава обрастания образцов с разными составами покрытий. Одновременно с этим выполнялись соскобы поверхности для проведения спектроскопической съемки.

Исследование поверхностей проходило в несколько этапов. На первом из них происходило микрофотографирование каждого из исследуемых образцов двумя способами: при помощи оптического инвертированного микроскопа Nikon-Ti-S и лазерного конфокального микроскопа, входящего в комплекс конфокального рамановского спектрометра Confotec NR-500. Данное оборудование входит в Центр коллективного пользования «Молекулярная структура вещества» Ресурсного центра пользования высокотехнологичным оборудованием Севастопольского государственного университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Примеры микрофотографий поверхностей исследуемых пластин до их экспонирования на морском полигоне приведены на рисунке 1. Микрофотографии соскобов с экспонированных на морском полигоне образцов в работе не приводятся, т.к. при их получении велика вероятность механического повреждения поверхности. Кроме того, для некоторых образцов необходимо отметить достаточно хорошее связывание покрытия с пластиной, в результате чего не представляется возможным изготовить соскоб с достаточно большой площадью поверхности.

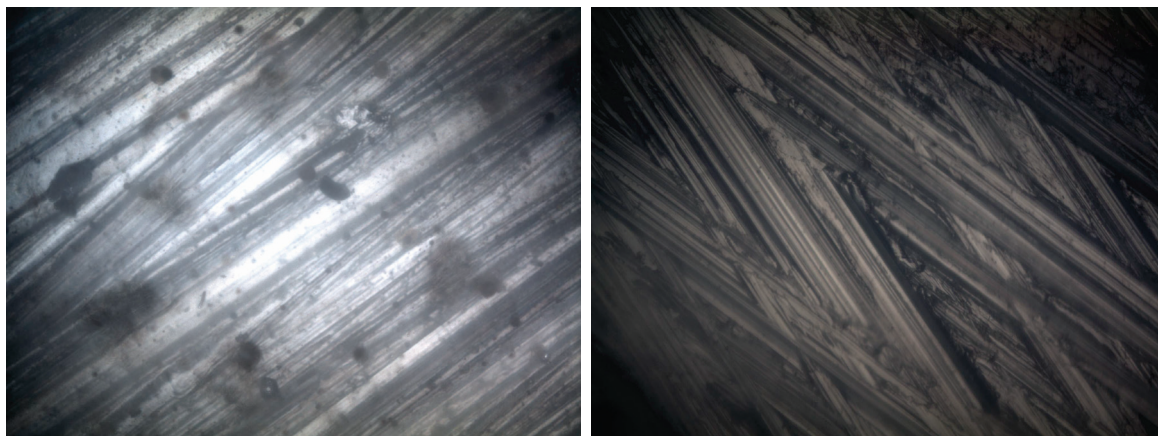


Рисунок 1. Оптическая микрофотография поверхности, покрытой эпоксидной смолой с добавлением 3% наночастиц (Fe-Zn)O (слева). Оптическая микрофотография поверхности, покрытой полиметилметакрилатом, растворенным в ацетоне с добавлением 3% наночастиц ZnO (справа)

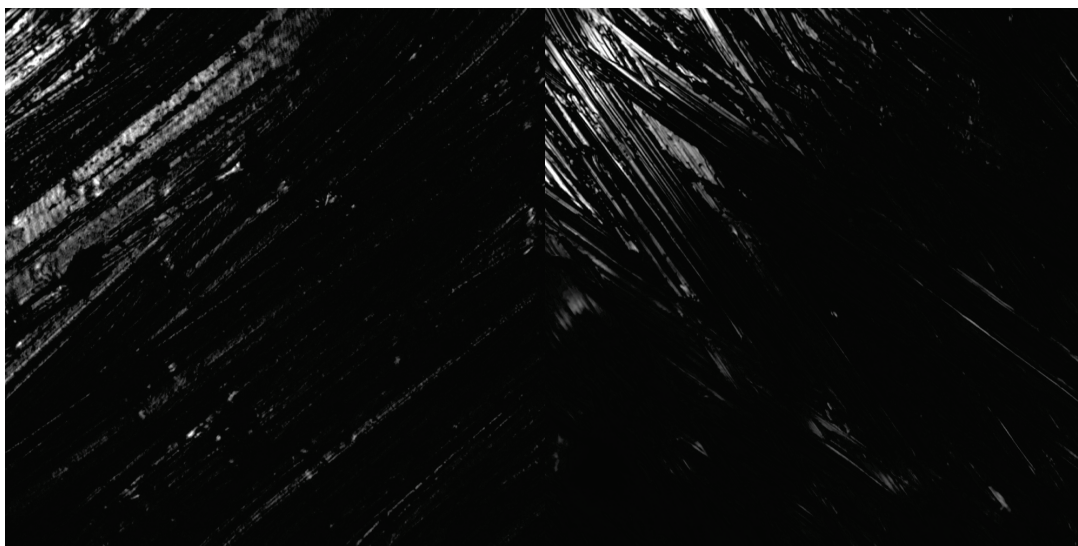


Рисунок 2. Микрофотографии поверхности, покрытой эпоксидной смолой с добавлением 3% наночастиц (Fe-Zn)O (слева) и полиметилметакрилатом, растворенным в ацетоне с добавлением 3% наночастиц ZnO (справа), полученные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

Микрофотографии образцов до экспонирования на полигоне, полученные методами лазерной сканирующей конфокальной микроскопии приведены на рисунке 2.

Данные фотографии были использованы для анализа качества нанесения противообрастающего покрытия на исследуемые образцы. На фото видно, что микросостояние поверхности характеризуется большим количеством микроскопических неровностей, облегчающих прикрепление микрообрастателей к поверхности образца и формированию биопленки. Также, возможно, данные изъяны на покрытии могут привести к механическому разрушению всего слоя экспериментального покрытия при взаимодействии с морской средой.

Также микрофотографии, сделанные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, нужны для того, чтобы выбрать точку на поверхности, с которой на следующем этапе будет регистрироваться спектр комбинационного рассеяния образца (рамановский спектр). Для доказательства однородности состава на каждой микрофотографии выбиралось несколько точек в разных местах образца, после чего полученные в них спектры накладывались друг на друга. Пример такого сравнения спектров приведен на рисунке 3.

Анализ данных спектров позволяет обоснованно говорить об однородности органической «матрицы», которая содержит наночастицы. К сожалению, конфигурация имеющегося в нашем распоряжении спектрометра комбинационного рассеяния не позволяет получать в спектрах пики, соответствующие наночастицам, и, следовательно, контролировать однородность их распределения по поверхности экспериментальных пластин.

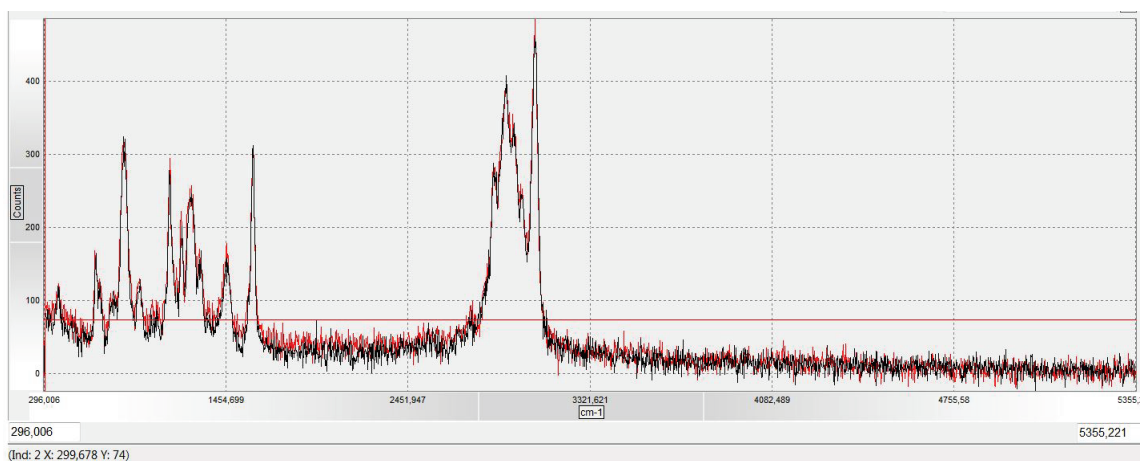


Рисунок 3. Сравнение рамановских спектров эпоксидной смолы, полученных в разных точках образца

Таблица 1. Основные характеристические длины волн эпоксидной смолы

Длина волны, см ⁻¹	Функциональная группа
930,045	Эпоксидная группа
1120,133	Упругая ароматическая С-Н связь в кольце
1198,721	СН ₃ /диметил деформационная связь и С ₆ -С _{7/8}
1244,176	С-О упругая связь (эфирная группа) и С-С упругая связь (от эпоксидной группы)

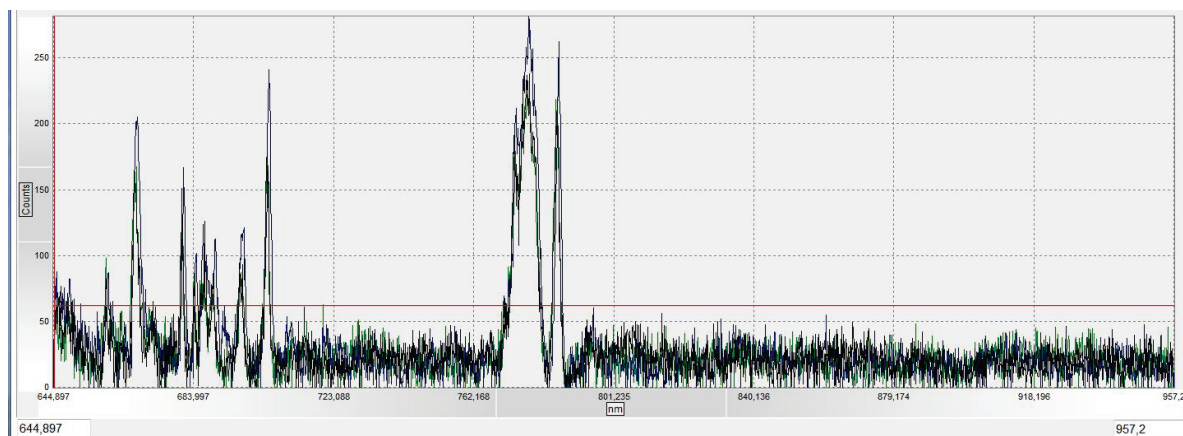


Рисунок 4. Сравнение рамановских спектров покрытия модифицированного наночастицами (Fe-Zn)O (3%) до их погружения в морскую среду и после месяца экспонирования

При регистрации спектров использовались следующие параметры: в качестве возбуждающего был использован красный лазер с длиной волны 632,8 нм, мощностью 10 мВт на предметном столике. Для всех экспериментальных кривых были использованы идентичные условия снятия спектров: режим съемки – накопление, 20 повторений с задержкой 0,01 мс между сканами, продолжительность каждого скана – 1 с, полученные сканы после усреднялись. Размер пинхола – 70 нм, без ослабления мощности входного лазерного излучения. Дифракционная решетка имеет 150 штрихов на мм. К спектрам применялся фильтр «RollingBall» с размером 100 единиц.

Основная идея контроля эффективности испытываемых противообрастающих покрытий заключается в косвенной ее оценке по степени изменения органической структуры матрицы покрытия при формировании биопленки на поверхности субстрата. В процессе биodeградации верхнего слоя покрытия разрушение существующих химических связей и образование новых должно проявляться в изменении соответствующих ИК и рамановских спектров.

Применение указанных спектрометрических методов в течение длительного экспонирования образцов в морской воде позволяет сравнить спектры и выявлять особенности деградационных процессов. На рисунке 4 представлены результаты такого сравнения для наночастиц (Fe-Zn)O с содержанием 3 массовых %. Очевидно, что на спектре не появилось новых пиков, а также не произошло изменений положения существующих. Из этого можно сделать вывод, что новых связей в органической «матрице» поверхности не образовалось, а также не произошло разрушения ранее детектированных связей. Этот установленный факт является косвенным свидетельством устойчивости слоя покрытия к биodeградационным процессам спустя месяц после начала экспонирования.

Параллельно с изучением состояния поверхности методами оптической и лазерной конфокальной микроскопии, рамановской спектроскопии для дополнительного анализа состояния покрытия был применен метод инфракрасной Фурье спектроскопии. Анализ также проводился на оборудовании ЦКП «Молекулярная структура вещества» РЦ СевГУ. Для исследования использовался Фурье-ИК спектрометр Simex FT-801. Примеры спектров покрытия, полученных на приставке многократного нарушенного полного внутреннего отражения с элементом из селенида цинка приведены ниже.

В настоящий момент осуществляется соотнесение полученных ИК спектров, а также сравнение их со спектрами комбинационного рассеяния.

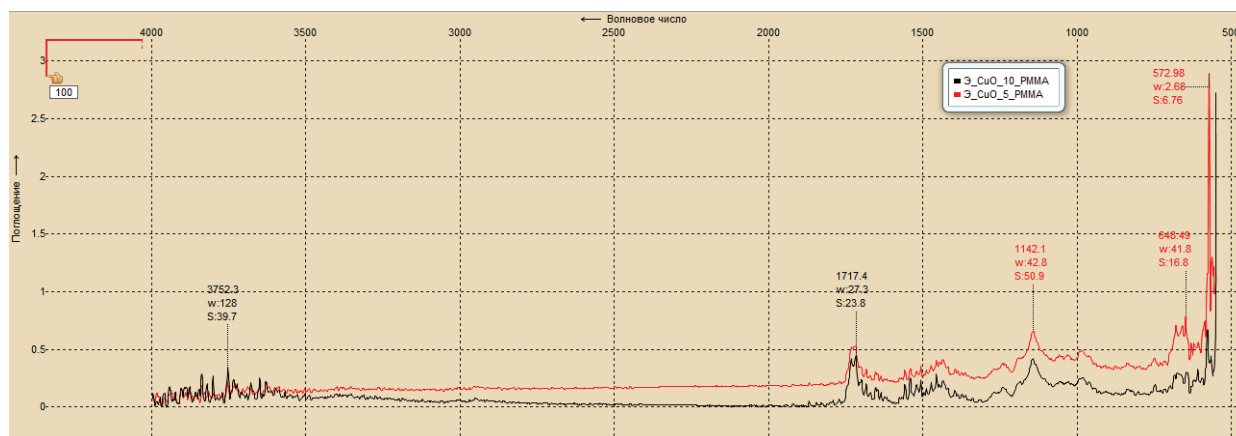


Рисунок 5. Сравнение ИК-спектров ПММА, модифицированного наночастицами CuO. Красная кривая – 5 % наночастиц, черная – 10%

В ходе дальнейшей работы планируется регистрация спектров поверхностей пластин с частотой один раз в месяц, их сравнение с исходными спектрами и анализ возможных изменений состояния поверхности вышеописанными спектрометрическими методами для установления наиболее эффективных составов противообрастающих покрытий, модифицированных наночастицами оксидов металлов.

Работа выполнена при поддержке гранта СевГУ № 47/06-31 «Биологически активные бикомпонентные наночастицы оксидов металлов как основа альтернативных композиций противообрастающих покрытий судов и гидротехнических сооружений».

Список литературы / References:

1. Chambers L.D., Stokes K.R., Walsh F.C., Wood R.J.K. Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 2006, vol. 201, iss. 6, DOI: 10.1016/j.surfcoat.2006.08.129.
2. Dobretsov S., Teplitski M., Bayer M., Gunasekera S., Chaidir C., Paul V. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling*, 2011, vol. 27. DOI: 10.1080/08927014.2011.609616.
3. Hellio C., Yebra D. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies 1st Edition* Woodhead Publishing, 2009, 784 p.
4. S. Dobretsov J.C. Thomason The development of marine biofilms on two commercial non-biocidal coatings: A comparison between silicone and fluoropolymer technologies, *Biofouling*, 2011, vol. 27, no. 8, DOI: 10.1080/08927014.2011.607233
5. Thomas K.V., Brooks S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*, 2010, vol. 26, no. 1, DOI: 10.1080/08927010903216564
6. Inbakandan D., Chandrasekaran K., Stanley S., Kirubakaran R., Venkatesan R., Khan S. Silver nanoparticles with anti microfouling effect: A study against marine biofilm forming bacteria. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2013, vol. 111, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.06.048.
7. Callow J., Callow M. Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nat. Commun.*, 2011, vol. 2, DOI: 10.1038/ncomms1251.
8. F. Tepper, M. Lerner, D. Ginley Metallic Nanopowders: An Overview. Encyclopedia Entry. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004, vol. 3. DOI: 10.1081/E-ENN-120009110.

STUDY OF SHIPBOARD COATINGS ENRICHED WITH METAL OXIDE NANOPARTICLES BY SPECTROSCOPIC METHODS

Mosunov A.A.¹, Evstigneev V.P.¹, Sizova O.S.^{1,2}, Lerner M.I.³

¹ Sevastopol State University

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

² Institute of Natural and Technical Systems

Lenin St., 28, Sevastopol, 299011, Russia

³ Institute of Strength Physics and Materials Science of Siberian Branch Russian Academy of Sciences
pr. Akademicheskii, 2/4, Tomsk, 634055, Russia

Abstract. The paper deals with the spectrometric methodology for estimating the biodegradation resistance of anti-fouling coatings containing nanoparticles of various metals. There are reasons to believe that this variant of biocide composition has lower toxicity in comparison with traditional compositions. The effectiveness of the coatings used in this work was shown earlier on model microorganisms. A state-of-the-art of the problem of antifouling coatings is briefly described as well as prospects of application of its modification with metal and bi-metal oxide nanoparticles. The technique of the experiment to determine the effectiveness of the studied coatings on marine organisms in vivo is described. During investigations by methods of optical and laser confocal scanning microscopy, Raman and infrared spectroscopy, the state of the coating was studied before it was immersed in an aqueous medium, as well as after a month of exposure at a specialized test site in the Sevastopol Bay. The obtained spectra were compared as well as the spectra of "control" samples (without nanoparticles) with the spectra of "working" coatings. It is shown that at the first stage of the research no pronounced changes in the state of the organic matrix of the coating were found.

Key words: nanoparticles, Raman spectroscopy, infrared spectroscopy, antifouling coatings.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЗАЩИТНЫХ ПОКРЫТИЙ КОРАБЛЕЙ С БИМЕТАЛЛИЧЕСКИМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

Мосунов А.А., Евстигнеев В.П., Сизова О.С., Головченко И.В., Завьялова О.С.,
Полупан Е.С., Дульчук Ю.Р.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 16.08.2020

Аннотация. В работе рассматривается состояние противообрастающих покрытий, модифицированных бикомпонентными наночастицами металлов. Данные покрытия могут быть эффективными средствами защиты кораблей и различных построек, имеющих прямое отношение к водоёмам, от прикрепления к ним различных микро-, а в последствии, и макрообрастателей. Их появление оказывает значительное негативное влияние на эксплуатационные характеристики плавсредств и гидротехнических сооружений вплоть до полной утери работоспособности. Существующие коммерчески доступные покрытия дают отличный результат, но не все из них сохраняют свои первоначальные показатели при длительной эксплуатации, тем самым приводя к необходимости периодической замены покрытия. В этой связи ключевым вопросом становится срок эксплуатации до утери полезных свойств. В дальнейших работах путём исследований методами инфракрасной Фурье спектроскопии планируется изучить состояние покрытия металлических пластин до их погружения в водную среду, а также после различных сроков экспонирования на специализированном полигоне в Севастопольской бухте. В качестве предварительного этапа проведено сравнение спектров до и после экспонирования, а также спектров «контрольных» образцов (без наночастиц) со спектрами «рабочих» покрытий. На основании сравнения данных спектров сделаны первичные выводы об изменениях, которые претерпели покрытия в ходе месяца экспонирования в морской среде. Исходя из полученных результатов, отмечены наночастицы металла, которые приводят к наименьшим структурным изменениям.

Ключевые слова: наночастицы, инфракрасная Фурье спектроскопия, противообрастающие покрытия.

Морское биообрастание судов и гидротехнических сооружений является мировой проблемой, которая до сих пор эффективно не решена. Защита подводной части судов от морского обрастания является одной из актуальных проблем современного судоремонта. Важность этой проблемы, в основном, определяется экономическими показателями доставки грузов судами и продолжительностью эксплуатации гидротехнических сооружений. Менее чем за шесть месяцев пребывания в море поверхность, не защищенная противообрастающими средствами, может собрать до 150 кг биозагрязнений на квадратный метр. Биообрастание судов приводит к снижению их ходовых качеств и повышенному расходу топлива.

В отечественном и зарубежном судостроении и судоремонте для защиты подводной поверхности различных плавсредств, морских платформ для газо- и нефтедобычи, доков используются многослойные защитные покрытия. Противообрастающий состав (краска, эмаль) поверхностного слоя такого покрытия защищает окрашенную поверхность от оседания гидробионтов-обрастателей, оказывая отравляющее действие на расселительные, ювенильные и даже взрослые их формы.

Основной механизм защитного действия всех противообрастающих красок – выделение (выщелачивание) токсичных или репеллентных соединений, препятствующих гидробионтам-обрастателям оседать и развиваться на окрашенной поверхности. В качестве таких соединений, как в зарубежных, так и отечественных красках используются составы на основе меди (в основном закись меди), металлоорганические соединения олова, мышьяка, кобальта, никеля, цинка, ртути, природные органические соединения, обладающие репеллентным, наркотирующим действием на личинки обрастателей и современные альтернативные безбиоцидные компоненты.

Скорость выщелачивания различных токсикантов противообрастающими красками регулирует матрица состава, которая представлена разнообразными лакокрасочными материалами: дивинилацетиленовыми, виниловыми, перхлорвиниловыми полимерами, полимерами на основе акриловой кислоты (полиакрилаты), канифолью, парафином, латексами. Основная цель подбора компонентов для матрицы – обеспечить равномерное, достаточно эффективное выщелачивание биоцидов.

Противообрастающие покрытия с биоцидами являются наиболее надежным способом предотвращения биологического обрастания в настоящее время. Преимуществами таких покрытий является простота нанесения, относительно низкая стоимость, возможность применения в разнообразных условиях.

Однако многочисленные исследования показывают, что все имеющиеся на данный момент решения имеют недостаточную эффективность. В связи с этим до сих пор сохраняется актуальность разработок новых высокоэффективных покрытий, препятствующих морскому биообрастанию судов и гидротехнических сооружений с одной стороны, и малотоксичных для окружающей среды – с другой.

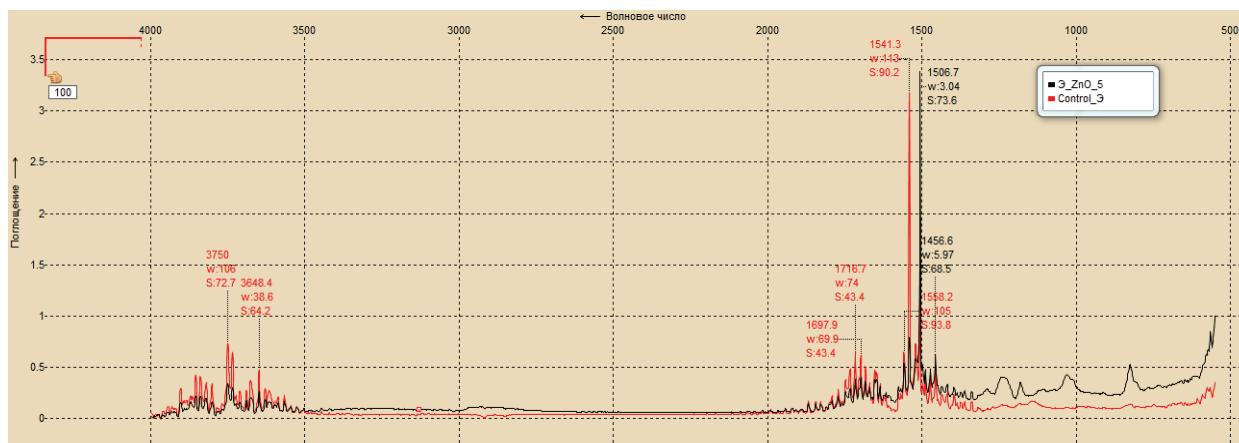


Рисунок 1. ИК-спектр ЭС и Э-ZnO₅ композита

Одним из основных трендов развития мировой науки в этом направлении является разработка новых, менее токсичных, но эффективных покрытий для профилактики биологического обрастания, основанных на применении наночастиц биологически активных металлов и их оксидов.

В текущей работе исследовались покрытия из эпоксидной смолы (в дальнейшем ЭС), а также её комплексов с наночастицами цинка, железа и меди в отсутствии и наличии полиметилметакрилата аммония (PMMA).

Спектр покрытия, содержащего чистую ЭС, приведен на рисунке 1 (красный). Наличие интенсивной полосы при 1541 см⁻¹, и менее интенсивного набора полос при 1600-1700 см⁻¹ относятся к колебаниям ароматического кольца олигомера [1]. Кроме того, серии полос в диапазоне 1300-1500 см⁻¹ относятся к деформационным колебаниям метильной и метиленовой групп. Колебания при 3500-3700 см⁻¹ соответствуют колебаниям гидроксильных групп. Слабая полоса симметричных колебаний эпоксидных групп (1250 см⁻¹) перекрывается полосой симметричных колебаний связи =C–O–C (1255 см⁻¹) [2]. Спектр композита Э-ZnO₅ (где 5-процентное содержание наночастиц в растворе; аналогично для других комплексов) (рис. 1) содержит те же полосы. Интенсивный пик ЭС при 1541 см⁻¹ сдвигается на 1506 см⁻¹ в композите, что может быть обусловлено образованием водородных связей между полимерной матрицей и наночастицами. Пики Zn–O наблюдаются в области 450-600 см⁻¹, вероятно в данном спектре они не попали в исследуемую область [3].

На рисунке 2 приведены ИК-спектры Э-PMMA (полиметилметакрилат аммония) и композита Э-FeZnO₅-PMMA. Спектры полностью идентичны друг другу. Полученный спектр Э-ZnO₅ композита практически идентичен спектру композита Э-FeZnO₅. На нем также идентифицируются полосы, характерные для ЭС и небольшое смещение при 1506 см⁻¹.

Полоса поглощения при 1143 см⁻¹ соответствует устойчивой цис-конформации эфирной группы PMMA [4]. Интенсивная полоса при 1718 см⁻¹ подтверждает наличие сложно-эфирной группы C=O [5]. Кроме того, в образце присутствует небольшое количество воды в виде колебаний гидроксильных групп при 3500-3700 см⁻¹. Колебаний, характерных для ЭС в образце не обнаруживается. Аналогичная картина наблюдается для композита Э-ZnO₅-PMMA. На ИК-спектре отображаются только полосы, соответствующие PMMA (рис. 3).

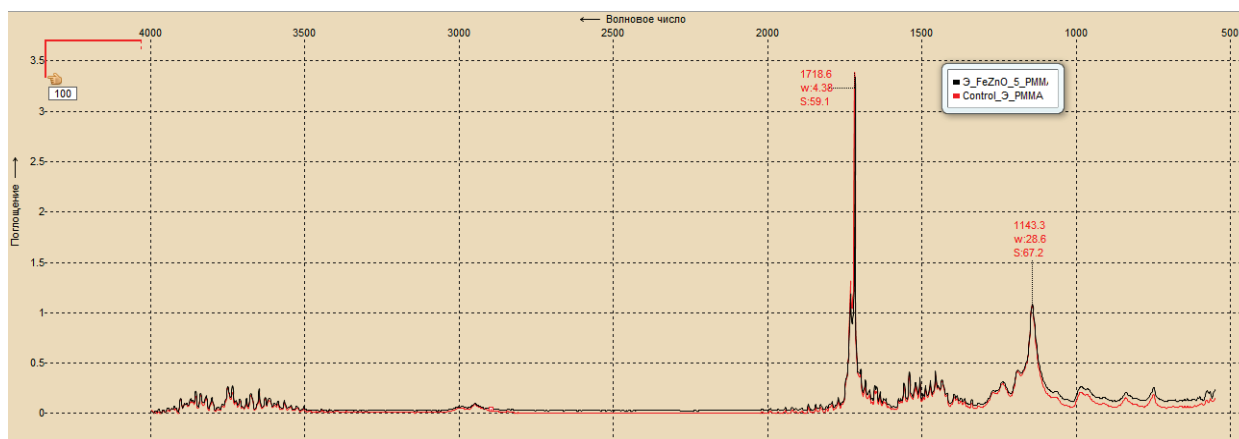


Рисунок 2. ИК-спектры Э-FeZnO₅-PMMA композита и полимерной матрицы Control_Э-PMMA

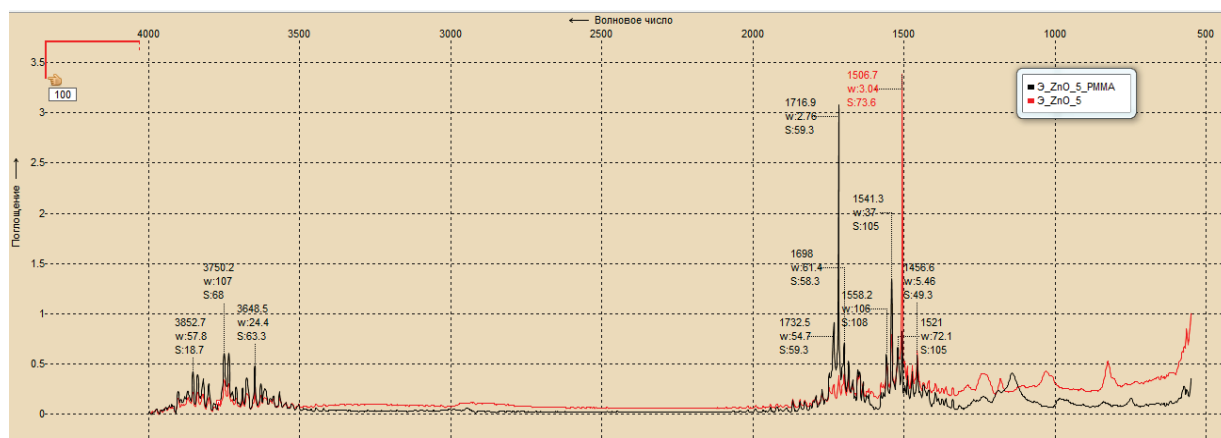


Рисунок 3. ИК-спектры композита Э-ZnO_5_PMMA

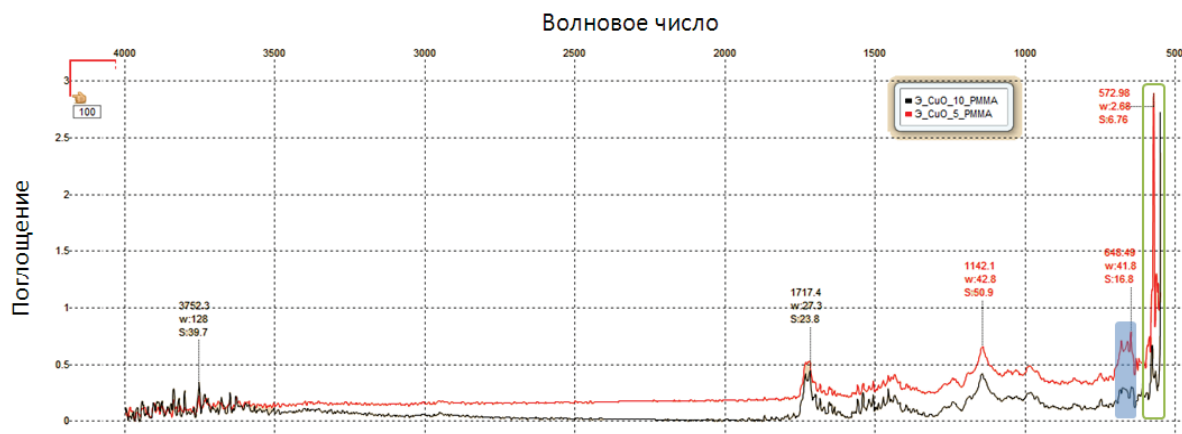


Рисунок 4. ИК-спектры композита Э_CuO_10_PMMA и Э_CuO_5_PMMA

В присутствии наночастиц CuO в композитах Э_CuO_10_PMMA и Э_CuO_5_PMMA (рис. 5), помимо основных полос, соответствующих PMMA, присутствуют дополнительные полосы при 570 см⁻¹ и 648 см⁻¹. Основная полоса при 570 см⁻¹ обусловлена наличием связи Cu-O в CuO (область в зелёной рамке на рис. 4) в моноклинной фазе. Наличие полосы в диапазоне от 605 до 660 см⁻¹ (при 648 см⁻¹) указывает на присутствие, помимо CuO, другой фазы, то есть Cu₂O (область выделена синим на рис. 4) [6]. Примечательным является тот факт, что увеличение концентрации наночастиц меди в растворе приводит к ослаблению отклика Cu₂O на ИК спектре, т.е. к уменьшению удельной концентрации данной фазы (на общем фоне).

Работа выполнена при поддержке Внутреннего гранта СевГУ «Биологически активные бикомпонентные наночастицы оксидов металлов как основа альтернативных композиций противообрастающих покрытий судов и гидротехнических сооружений», 47/06-31.

Список литературы / References:

1. Guo J. et al. Reinforced magnetic epoxy nanocomposites with conductive polypyrrole nanocoating on nanomagnetite as a coupling agent. *RSC advances*, 2014, vol. 4, no. 69, pp. 36560-36572.
2. Чашкин М.А. и др. ИК спектроскопическое исследование структуры эпоксидной композиции, модифицированной медью/углеродным наноккомпозитом, и процессов, связанных с ее модификацией. *Химическая физика и мезоскопия*, 2012, т. 14, № 2. [Chashkin M.A. et al. IR spectroscopic study of structure of epoxy composition modified by copper/carbon nanocomposite and processes related to its modification. *Chemical physics and mesoscopy*, 2012, vol. 14, no. 2. (In Russ.)]
3. Othman N.H. et al. Highly dispersed graphene oxide-zinc oxide nanohybrids in epoxy coating with improved water barrier properties and corrosion resistance. *Journal of Coatings Technology and Research*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 101-114.
4. Абдуллаев Х.М., Шаимов Э.Д., Табаров Ф.С. ИК-спектроскопическое исследование спектров поглощения исходных и фуллеренсодержащих плёнок полиметилметакрилата, полученных из растворов в толуоле, бромбензоле и ортоксилоле. *Доклады Академии наук Республики Таджикистан*, 2013, т. 56, № 3. [Abdullaev H.M., Shaimov E.D., Tabarov F.S. IR-spectroscopic study of absorption spectra of initial and fullerene-containing films of polymethylmethacrylate obtained from solutions in toluene, brombenzene and orthoxylylene. *Reports of the Academy of Sciences of the Republic of Tajikistan*, 2013, vol. 56, no. 3. (In Russ.)]

5. Sugumaran D., Karim K.J.A. Removal of copper (II) ion using chitosan-graft-poly (methyl methacrylate) as adsorbent. *Eproc. Chem.*, 2017, vol. 2, pp. 1-11.
6. Ethiraj A.S., Kang D.J. Synthesis and characterization of CuO nanowires by a simple wet chemical method. *Nanoscale research letters*, 2012, vol. 7, no. 1, p. 70.

INFRARED SPECTROSCOPY OF PROTECTIVE COVERINGS OF SHIPS WITH BIMETALLIC NANOPARTICLES

Mosunov A.A., Evstigneyev V.P., Sizova O.S., Golovchenko I.V., Polupan E.C., Dulchuk Yu.

Sevastopol State University

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

Abstract. The paper considers the condition of anti-fouling coatings modified by biocomponent metal nanoparticles. These coatings can be effective means of protection of ships and various structures directly related to water bodies from the attachment of various micro- and, subsequently, macro-fouling to them. Their appearance has a significant negative impact on the performance of watercraft and hydraulic structures up to complete loss of serviceability. Many offered coverings yield excellent result. But far not all of them keep the initial indicators at long-term operation, thus leading to necessity of periodic replacement of the covering. And from this point of view the term of operation before the loss of useful properties becomes a key issue. The condition of metal plates covering before their immersion in water environment, and also after one month of exposure on a specialized polygon in the Sevastopol bay was studied by methods of IR Fourier spectroscopy. Spectra before and after exposure, as well as spectra of "control" samples (without nanoparticles) with spectra of "working" coatings are going to be compared. The first step of this research is the comparison of pure and modified epoxy resin IR specters. Based on the obtained results, metal nanoparticles that lead to the smallest structural changes were selected.

Key words: nanoparticles, infrared Fourier spectroscopy, anti-fouling coverings.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2020 ГОД

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Сравнение конформационных свойств антигипертензивных молекул овокинина (2-7) и новокинина..... № 2, с. 246-249
- Агаева Г.А., Сеферли Г.Р., Годжаев Н.М. Структурные и конформационные особенности фрагментов молекулы гиламбатина № 2, с. 250-252
- Апашева Л.М., Лобанов А.В., Лукина Н.А., Сергейчев К.Ф. Развитие *in vitro* растений огурца «Конкурент» на ранних этапах роста в условиях фотореспирационного стресса № 4, с. 592-595
- Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., Албет М.А. Гетероассоциация молекул тиазинового красителя и кофеина в водном растворе..... № 3, с. 399-404
- Гасанова А.Е. The influence of phytocompositions dandelion-burdock on electrophysiological characteristics of *Chara fragilis* cells № 1, с. 29-34
- Гулин А.С., Тренкеншу Р.П., Чернышев Д.Н. Декомпозиция красной области спектра поглощения – начальный метод оценки пигментного состава микроводорослей № 2, с. 239-245
- Дегтяр И.В., Лантушенко А.О., Лелеков А.С. Сравнительный анализ различных протоколов выделения ДНК *Arthrospira platensis* № 4, с. 587-591
- Замятнин А.А., Белозерская Т.А. Биологически активные фрагменты белковых структур глобального протеома № 1, с. 69-80
- Кораблев Г.А. Энтропийные характеристики вируса № 1, с. 63-68
- Кочарли Н.К., Гумматова С.Т. Структурно-функциональное состояние плазматических мембран клеток дрожжей при действии γ – излучения..... № 2, с. 223-228
- Кулешова Т.Э., Желнина А.И., Удалова О.Р., Панова Г.Г., Галль Н.Р. Динамика конверсии света листьями растений в электрический ток в прикорневой зоне..... № 3, с. 379-385
- Кусова А.М., Ситницкий А.Э., Зуев Ю.Ф. Белок-белковые взаимодействия по данным трансляционной диффузии № 1, с. 81-84
- Лелеков А.С., Ключкова В.С., Гаджи А.В. Максимальная продуктивность накопительной культуры *Porphyridium purpureum* и *Arthrospira platensis* при различной освещенности..... № 2, с. 253-260
- Лобышев В.И. О проблеме влияния малых концентраций на биологическую активность № 3, с. 390-398
- Махмудова Ш.С., Мусаев Н.А. Функциональная активность и структурная лабильность плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa*..... № 1, с. 35-42
- Мегер Я.В., Лантушенко А.О., Водясова Е.А. Влияние степени фильтрации данных секвенирования на качество и полноту de novo сборки транскриптома № 4, с. 580-586
- Мегер Я.В., Лантушенко А.О., Яковлева Ю.А., Ельцов О.С. Использование различных экспериментальных методик ЯМР-спектроскопии для анализа агрегации платиносодержащих соединений NNC-типа № 1, с. 24-28
- Нечипуренко Ю.Д., Семёнов Д.А. Неканонические пары GC и эпигенетика..... № 4, с. 567-570
- Новиков В.В., Яблокова Е.В., Шаев И.А. Молекулярные механизмы действия магнитной депривации на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами № 2, с. 217-222
- Оксенгендлер Б.Л., Тураева Н.Н., Никифорова Н.Н., Минина М.В., Чечулина М.В., Искандарова Ф. Гипотеза об универсальной роли Оже-каскада в отборе элементного состава и хиральной диссиметрии макромолекул в живых системах № 4, с. 571-579
- Полозов Р.В., Грохлина Т.И., Панченко Л.А., Иванов В.В. Многомерный статистический анализ пространственных структур ДНК в интерфейсах комплексов гомеодомен-ДНК: «диккерсоновы параметры» № 3, с. 386-389
- Рагульская М.В., Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Обридко В.Н. Биофизические и гелиофизические факторы в развитии пандемии вируса SARS-CoV-2..... № 1, с. 9-17

- Сажина Н.Н., Попов И.Н., Семенова М.Г., Антипова А.С., Мартиросова Е.И., Пальмина Н.П.** Влияние состава длительной функциональной липосомной диеты на антиоксидательную активность липидов мозга мышей № 1, с. 18-23
- Хечинашвили Н.Н., Кондратьев М.С.** Термодинамика нативной структуры глобулярного белка № 2, с. 229-231
- Чернышев Д.Н., Горбунова С.Ю., Тренкеншу Р.П.** Разделение спектров поглощения культуры и ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* на спектры отдельных пигментов № 2, с. 232-238
- Чукова Ю.П.** Энергетические законы биофизики: теория и эксперимент № 1, с. 52-62
- Яхно Т.А., Яхно В.Г.** Исследование роли микродисперсной фазы воды при переходе ее в состояние активации № 1, с. 43-51

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.** Пространственная структура молекулы α -S1-казоморфина № 1, с. 114-117
- Ахвердиева Г.А., Демухамедова С.Д., Годжаев Н.М.** Молекулярное моделирование вилона № 1, с. 101-108
- Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Гаджиева Ш.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.** Пространственная структура молекулы сойморфина-7 № 1, с. 109-113
- Быстров В.С., Филиппов С.В., Жулябина О.А., Твердислов В.А.** Молекулярное моделирование структуры и свойств дифенилаланиновых пептидных нанотрубок разной хиральности, содержащих молекулы воды № 2, с. 261-268
- Велиева Л.И., Алиев Р.Э.** Пространственное строение и конформационная подвижность нейрпептида *Leu*-галлатостатина 2 № 1, с. 125-129
- Долгов А.А., Богачева Е.Н., Ксенофонтов А.Л.** Специфика пространственной структуры белков оболочки потексвирусов № 3, с. 429-433
- Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.** Структурная организация глипролиновых аналогов № 1, с. 85-90
- Клочков Б.Н.** Моделирование динамики крупных кровеносных сосудов № 2, с. 274-277
- Костюкова Л.О., Леонтьева С.В., Воронин Д.П., Рыбакова К.А., Бучельников А.С., Костюков В.В.** Электронные состояния акридинового оранжевого в водном растворе № 2, с. 269-273
- Костюкова Л.О., Леонтьева С.В., Воронин Д.П., Рыбакова К.А., Бучельников А.С., Костюков В.В.** Фотоиндуцированный перенос заряда в молекуле нильского красного № 3, с. 424-428
- Костюкова Л.О., Леонтьева С.В., Воронин Д.П., Рыбакова К.А., Бучельников А.С., Костюков В.В.** Теоретический анализ фотоиндуцированных электронных переходов акридинового желтого № 4, с. 614-618
- Краснобаева Л.А., Якушевич Л.В.** Термодинамические потенциалы идеального газа нелинейных конформационных возмущений – кинков, активированных в кольцевой плазмиде pTTQ18 № 1, с. 118-124
- Мендоза-Баез Р., Моралес М.А., Луна Флорес А., Агустин Серрано Р., Сервантес Тавера А.М., Эрнандес Сантьяго А.А.** Modeling reaction kinetics of ZnO microparticles synthesized via microwave: ab initio simulation № 4, с. 596-603
- Орлов М.А., Дзелядин Т.Р., Сорокин А.А.** Геномный каскад промоторов бактериофага T7: участие вызванной суперспиральностью дестабилизации дуплекса ДНК (SIDD) № 3, с. 412-414
- Соларес Э., Моралес М.А., Луна-Флорес А., Сервантес-Тавера А.М., Эрнандес-Сантьяго А.А.** Modeling and computational simulation of photocatalysis of a bismuth oxalure for air remediation № 4, с. 604-608
- Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф.** Миграция орцинола через модельные мембраны *Escherichia coli* № 4, с. 619-622
- Филиппов С.В., Лихачёв И.В., Быстров В.С.** Визуально-дифференциальный анализ структурных перестроек водных кластерных структур, находящихся во внутренней полости D-FF нанотрубок № 3, с. 415-423

- Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Чупин В.В., Демина О.В. Исследование селективности окружения хромофор связывающего сайта молекулы бактериородопсина с помощью аналогов ретиноидов.....№ 1, с. 91-100
- Чекушкин А.А., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г. Сезонная динамика предельной продуктивности в горизонтальном фотобиореакторе№ 3, с. 405-411
- Эрнандес Агирре Дж.А., Арзола Флорес Дж.А., Видаль Роблес Е., Савиньон Флорес Ф., Мальдонадо Гарсия А., Гуарнерос Беджарано Г., Рохас Родригез Ф., Эрнандес Сантьяго А.А. Multilayer perceptron neural network for the prediction of the ripening stages of fruits and vegetables.....№ 4, с. 609-613

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Авакян С.В., Баранова Л.А. Микроволновые излучения в онкологии: о возможности торможения злокачественного митоза№ 4, с. 680-689
- Аширметов А.Х., Искандарова Ф., Никифорова Н.Н., Оксенгендлер Б.Л. Солитонная доставка возбуждений и стимулирование биохимических реакций медицинского назначения в живых системах.....№ 4, с. 629-636
- Багирова А.А. Физико-химические свойства комбинированных ионных каналов, индуцируемых макроциклическими полиеновыми антибиотиками различной химической структуры в бислойных липидных мембранах№ 1, с. 158-163
- Бакурова Е.М., Дорошкевич В.С., Добаева Н.М., Турсунова Ю.Д. О роли эритроцитов в перераспределении железа в тканях у больных раком распространенных стадий.....№ 4, с. 690-692
- Бирулина Ю.Г., Буйко Е.Е., Габитова И.О., Иванов В.В., Смаглий Л.В., Носарев А.В., Ковалев И.В., Гусакова С.В. Роль $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспорта в регуляции сократительных реакций гладких мышц сосудов при метаболическом синдроме№ 2, с. 321-325
- Веляев Ю.О., Майоров Д.В. Исследование некоторых физико-химических свойств кремниевых сорбентов, полученных на основе нефелинового концентрата.....№ 2, с. 354-358
- Венская Е.И., Лукьяненко Л.М., Скоробогатова А.С. Влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на состояние липидного бислоя лимфоцитов человека в условиях окислительного стресса *in vitro*№ 3, с. 450-455
- Внуков В.В., Кролевец И.В., Плотников А.А., Ананян А.А., Колесников М.А., Милютин Н.П. Роль системы оксида азота и провоспалительных цитокинов в механизмах патогенеза дегенеративных заболеваний суставов№ 4, с. 665-671
- Гармаза Ю.М. Детергент-резистентные мембраны в эритроцитах человека: влияние ионов цинка на их модификацию№ 4, с. 623-628
- Генералов Е.А., Генералова Л.В. Влияние полисахаридов на течение COVID-19№ 4, с. 693-696
- Головко В.А., Козловская А.В. Калиевые каналы играют ключевую роль в формировании автоматии в синоаурикулярном узле мыши№ 4, с. 704-708
- Григорьян А.Л., Золотавина М.Л. Выбор метода определения активности ферментов разных классов в зависимости от их локализации в клетке№ 2, с. 305-309
- Дубинин М.В., Семенова А.А., Выдрина В.А., Шарапов В.А., Степанова А.Е., Теньков К.С., Хорошавина Е.И., Белослудцев К.Н. Тритерпеноиды лупанового ряда как модуляторы функциональной активности митохондрий печени крыс№ 2, с. 296-300
- Жигачева И.В., Русина И.Ф., Васильева С.В., Петрищева М.С. Ресвератрол повышает устойчивость организма к стрессовым воздействиям№ 1, с. 130-139
- Золотавина М.Л. Корреляционная связь методов функциональной диагностики и биохимических методов исследования в оценке формирования патологии третьего триместра беременности.....№ 2, с. 339-344
- Иванова А.А., Прядун В.В., Ефанов А.Н., Яковенко С.А., Симоненко Е.Ю. Термодинамические и структурные особенности водно-глицериновых растворов как основного компонента криопротекторных сред для криоконсервации клеток.....№ 3, с. 434-437

- Истомин Д.С., Золотавина М.Л.** Иммунохемилюминесцентный анализ как альтернатива тан-
демному методу ВЭЖХ-масс-спектрометрии для определения концентрации вальпроевой
кислоты в сыворотке крови..... № 2, с. 345-348
- Казаринов К.Д., Полников И.Г., Чеканов А.В., Титов С.В.** Роль наночастиц в изучении био-
логической чувствительности электромагнитного излучения в радио и микроволновом диа-
пазоне № 1, с. 169-176
- Касумов Э.А., Касумов Р.Э., Касумова И.В.** Механизм действия препаратов ПУЛДИС энер-
гет Р и ПУЛДИС герпофф К на энергетику и их роль в профилактике старения и возраст-
зависимых болезней..... № 2, с. 278-285
- Климкович Н.Н., Зубрицкая Г.П., Козарезова Т.И., Слобожанина Е.И.** Особенности физи-
ко-химических свойств мембран эритроцитов при миелодиспластических синдромах у де-
тей..... № 3, с. 494-498
- Колтовая Н.А.** Моделирование мутантной формы инозин трифосфат пиррофосфогидролазы
человека P32T-ITPA и потенциальные регуляторные химические модификации фермента № 4, с. 637-643
- Колтовая Н.А., Жучкина Н.И., Душанов Э.Б.** Распределение мутаций в молекуле белка
дрожжевой аргинин пермиазы CAN1 № 4, с. 644-651
- Крипакова В.В., Золотавина М.Л.** Использование метода ИФА в диагностике острых кишеч-
ных инфекций, вызванных норо- и ротавирусами № 2, с. 349-353
- Маслова Г.Т., Алексеенко Н.А., Коваленко М.Н., Титова А.В., Патапович М.П., Зажо-
гин А.П.** Использование морфоструктурного анализа и атомно-эмиссионной спектрометрии
высохших капель плазмы крови для диагностики пациентов с опухолями головного мозга..... № 3, с. 438-443
- Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И.** Нейро-
лептик трифлуоперазин подавляет стимулирующее влияние иммуномодулятора глутокси-
ма на транспорт Na^+ в коже лягушки № 2, с. 335-338
- Меркулова Н.Л., Грехнева Е.В., Чуйкова С.В., Малышев В.Н.** Хромато-масс-
спектрометрическое исследование пептидов кожного секрета безчешуйчатого вида рыб № 3, с. 461-466
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И.** Производ-
ное пиразола YM-58483 ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} в макрофагах..... № 1, с. 164-168
- Муслов С.А., Арутюнов С.Д., Бабайцева Л.А.** Влияние молока и молочных продуктов на
твёрдость и шероховатость зубной эмали № 1, с. 140-153
- Муслов С.А., Бабайцева Л.А., Хасанов Ф.К.** О влиянии напитков и питьевой воды на меха-
нические свойства зубной эмали № 3, с. 485-493
- Набережных Г.А., Сергеев А.А., Портнягина О.Ю., Чистюлин Д.К., Сидорин Е.В., Нови-
кова О.Д.** Биоконъюгирование коллоидных квантовых точек сульфидов кадмия и надмоле-
кулярных структур белка-порина из бактерий рода *Yersinia*. Получение и характеристика..... № 4, с. 652-658
- Нагорнова П.В., Белкин А.В., Дубровский В.Н., Елифанов А.В., Шалабодов А.Д.** Оценка
реологических детерминант крови человека с железодефицитной анемией в сравнении с
аналогичными показателями крови здоровых людей..... № 3, с. 499-504
- Панкова С.М., Сакибаев Ф.А., Королева В.А., Ольшанникова С.С., Холявка М.Г., Артю-
хов В.Г.** Поиск *in silico* возможных сайтов связывания с носителями при иммобилизации
протеолитических ферментов № 3, с. 456-460
- Петрова И.В., Бирулина Ю.Г., Буйко Е.Е., Алибаева Л.Ф., Смаглий Л.В., Гусакова С.В.**
Механизмы регуляции Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов при
метаболическом синдроме № 1, с. 182-186
- Пластун И.Л., Захаров А.А., Наумов А.А.** Моделирование межмолекулярного взаимодей-
ствия флагеллина и солей металлов в ходе образования наночастиц сульфида серебра мето-
дом бактериального синтеза № 3, с. 467-473
- Погорелов А.Г., Степанова Т.А., Погорелова В.Н., Суворов О.А., Гулин А.А.** Nutrition addi-
tive of E322 as phosphatidylcholine source for envelope in nanoscale formulation..... № 2, с. 286-290
- Прокопенко Т.А., Нечипуренко Н.И., Коваленко М.Н., Пашковская И.Д., Патапо-
вич М.П., Забогин А.П.** Оценка динамики метаболизма ЖНЭ в организме пациентов с за-
болеваниями головного мозга методами атомно-эмиссионной спектрометрии образцов
плазмы крови..... № 2, с. 310-316

- Прокопенко Т.А., Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Зажогин А.П.** Лазерная атомно-эмиссионная спектрометрия, морфоструктурный анализ дегидратирующих капель биоожидкостей и окислительный стресс у пациентов с хронической ишемией мозга при лазерном облучении крови № 3, с. 444-449
- Роденко Н.А., Васильева Т.И., Беляева И.А.** Влияние микроокружения на активность лекарственных препаратов, облученных импульсным магнитным полем..... № 1, с. 154-157
- Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Михлина Е.В., Симунин М.М., Рыжков И.И., Бондарь В.С.** Получение композита из нановолокон оксида алюминия и наноалмазов и изучение его физико-химических свойств № 2, с. 326-330
- Смирнова О.Д., Лукьяшин В.Е., Сёмочкина Ю.П., Латушкин С.Т., Родина А.В., Москалёва Е.Ю.** Использование пленочной дозиметрии и моделирования глубинного распределения поглощенной дозы при облучении клеток мыши низкими дозами протонов на циклотроне У-150..... № 4, с. 697-703
- Смоленцева Д.А., Миронова А.Г., Сыбачин А.В., Афанасьева С.И., Симоненко Е.Ю.** Модификация криопротекторной среды компонентами яичного желтка для повышения выживаемости сперматозоидов человека после криоконсервации..... № 2, с. 291-295
- Султанова Г.Г.** Анализ возможных механизмов гемолиза, вызываемого полиеновыми антибиотиками № 1, с. 177-181
- Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Пасюков В.В., Слобожанина Е.И.** Экспрессия транспортных и цитозольных белков при формировании множественной лекарственной устойчивости в клетках миеломы человека *in vitro* № 4, с. 672-679
- Файзуллин Д.А., Валиуллина Ю.А., Сальников В.В.** Структура композитных гидрогелей на основе фибрина и галактана картофеля № 4, с. 659-664
- Храмцова Е.А., Крашенинников С.В., Петронюк Ю.С., Трофимова Н.Н., Гурьева Т.С., Дадашева О.А., Левин В.М., Григорьев Т.Е., Зак П.П.** Влияние разных типов освещения на механические свойства склеры на примере японского перепела *Coturnix japonica* № 2, с. 331-334
- Черенков И.А., Березина Л.С., Кривилев М.Д., Сергеев В.Г.** Диффузия толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле при воздействии пепсина № 3, с. 481-484
- Шаймарданова Г.Ф., Гайсин И.А., Васильева А.Р., Краснова Л.А.** Динамика экспрессии генов в поясничном утолщении спинного мозга и седалищном нерве мыши при моделировании гипогравитации № 2, с. 317-320
- Шлихт А.Г., Краморенко Н.В.** Геном-центрированная интеллектуальная системно-кибернетическая структурированная модель в задачах оптимального синтеза рационов человека № 2, с. 301-304
- Щелконогов В.А., Баранова О.А., Чеканов А.В., Казаринов К.Д., Шастина Н.С., Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Соловьева Э.Ю., Федин А.И., Сорокоумова Г.М.** Антиагрегационное действие липосомальной формы, содержащий липоевую кислоту с карнозином..... № 1, с. 187-193
- Щербатюк Т.Г., Ляхова А.А., Жукова Е.С., Жилиева Т.В., Пятойкина А.С., Семенов И.В., Цвет А.Л., Гапеев А.Б.** Активность свободнорадикальных процессов у пациентов с первым эпизодом шизофрении..... № 3, с. 474-480

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

- Акшинцев А.А., Морозова Г.И., Козлова М.А., Баренбойм Г.М.** Выявление адаптогенного и защитного действия экстрактов из термофильных водорослей на энергетику лейкоцитов в нативной крови по флуоресценции потенциал - чувствительного зонда ДСМ № 3, с. 536-542
- Аленина К.А., Алескерова Л.Э., Исмаилов А.Д.** Экологические особенности морских светящихся бактерий Арктического региона № 4, с. 713-717
- Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Исмаилов А.И.** Специфические спектральные и эмиссионные характеристики низкотемпературных штаммов морских фотобактерий № 4, с. 709-712
- Беспалова С.В., Романчук С.М., Чуфицкий С.В.** Параметры флуоресценции и динамика роста культуры *Chlorella sorokiniana* при различном содержании биогенных веществ № 3, с. 511-516

- Дубас В.В., Алексашкин И.В., Мосунов А.А., Якимова К.В. Спектральные исследования лугово-черноземных почв Белогорского района Республики Крым.....№ 2, с. 359-368
- Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г. Измерение плотности культур диатомовых водорослей различными методами№ 1, с. 201-207
- Иванова Э.А. Биофизическая экология в ракурсе концепции супрамолекулярной биохимии.....№ 1, с. 194-200
- Лисютин В.А., Ластовенко О.Р., Дегтяр А.Д., Ярошенко А.А., Петренко Н.В., Лучин В.Л., Рыбакова К.А., Мирошниченко Е.В. Частотно-временной анализ подводных звуков морских млекопитающих. Зубатые киты№ 4, с. 718-724
- Лисютин В.А., Ластовенко О.Р., Дегтяр А.Д., Ярошенко А.А., Петренко Н.В., Лучин В.Л., Рыбакова К.А., Папков С.О. Частотно-временной анализ подводных звуков морских млекопитающих. Усатые киты.....№ 3, с. 543-549
- Мосунов А.А., Евстигнеев В.П., Сизова О.С., Головченко И.В., Завьялова О.С., Полупан Е.С., Дульчук Ю.Р. Исследование методами инфракрасной спектроскопии защитных покрытий кораблей с биметаллическими наночастицами№ 4, с. 730-733
- Мосунов А.А., Евстигнеев В.П., Сизова О.С., Лернер М.И. Исследование спектроскопическими методами судовых покрытий, обогащенных наночастицами оксидов металлов№ 4, с. 725-739
- Неверов К.В. Light acclimation of unicellular red alga *Rhodella violacea*: ΔpH build up, antenna reassembling and photoprotection.....№ 3, с. 550-556
- Скуратовская Е.Н., Дорошенко Ю.В., Алёмова А.С., Ковалева М.А. Биоиндикационная оценка экологического состояния прибрежных акваторий г. Севастополя№ 3, с. 517-523
- Солдатов А.А., Парфенова И.А. Скелетные мышцы морских рыб и молекулярные системы утилизации кислорода (краткий обзор)№ 3, с. 524-535
- Трофименко Я.В., Калинин О.В., Чиванов В.Д., Калинин А.Н., Данильченко С.Н. Исследование влияния рентгеновского излучения на прорастание и синтез пигментов у *Raphanus sativus*№ 3, с. 505-510