

ISSN 2499-9962

**НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ**

**Актуальные вопросы  
биологической физики  
и химии**

**Том 8, № 3  
2023**

**Севастополь**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И  
ХИМИИ**

**Научный журнал**

**Том 8, № 3  
2023**

**RUSSIAN JOURNAL of  
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY  
Volume 8, No. 3, 2023**

Севастополь  
2023

## 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, моделированию в биофизике, биоинформатике, медицинской биофизике, биофизической химии, биофизической экологии и биологическим ресурсам. 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

Ануфриева Е.В. (Севастополь);  
Костюков В.В. (Севастополь);  
Нечипуренко Ю.Д. (Москва);  
Пионтковский С.А. (Севастополь);  
Ризниченко Г.Ю. (Москва);  
Семенов К.Н. (Санкт-Петербург);  
Солдатов А.А. (Севастополь);  
Холявка М.Г. (Воронеж);  
Шейнман М. (Севастополь);  
Эрнандес Сантьяго А.А. (Пуэбла, Мексика).

### Editorial Board

Anufrieva E.V. (Sevastopol);  
Hernandez Santiago A.A. (Puebla, Mexico);  
Holyavka M.G. (Voronezh);  
Kostjukov V.V. (Sevastopol);  
Nechipurenko Yu.D. (Moscow);  
Piontkovski S.A. (Sevastopol);  
Riznichenko G.Yu. (Moscow);  
Semenov K.N. (Saint Petersburg);  
Sheinman M. (Sevastopol);  
Soldatov A.A. (Sevastopol).

### Ответственный секретарь

Воронин Д.П. (Севастополь).

### Executive Secretary

Voronin D.P. (Sevastopol).

Рекомендован к печати Ученым советом ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет».

## СОДЕРЖАНИЕ

Том 8, № 3, 2023

**ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА****Н.А. Касьяненко, В.М. Бакулев, Д.А. Артамонова**

Формирование и изучение многокомпонентных систем, содержащих биологически активные агенты, спектральными и гидродинамическим методами .....237

**Л.Н. Галль, Т.Э. Кулешова, И.Р. Галль**

Две формы структурирования воды в протоплазме живых клеток и их роль в биоэнергетике ..... 242

**Е.В. Федотова, С.В. Пастон**

Взаимодействие сывороточного альбумина человека с ионами кобальта и катехином ..... 248

**Т.Э. Кулешова, П.В. Желначева, З.А. Гасиева, А.С. Галушко, Г.Г. Панова**

Поиск потенциалобразующих ионов в питательном растворе биоэлектрохимической системы ..... 258

**Н.А. Касьяненко, В.И. Ролич, Д.А. Никитин**

Комплексы железа (III) с катехином и их взаимодействие с ДНК .....265

**М.А. Суслов, Д.В. Егоров, А.Г. Даминова, А.В. Анисимов, Д.В. Самигуллин, А.Р. Мустафина, О.Д. Бочкова**

Использование парамагнитных флуоресцентных наночастиц и метода спин-эхо ЯМР для комплексного исследования транспорта воды в корнях интактных растений ..... 271

**МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА****И.Н. Левченко, Г.К. Владимиров, И.В. Володяев, Ю.А. Владимиров**

Свободные радикалы. особенности хемилюминесцентной активности катализатора цитохрома c в комплексе с кардиолипином .....277

**А.Л. Литвиненко, В.М. Некрасов, Е.С. Ястребова**

Использованием оптической модели «сплюснутый сфероид» для приближения формы активированного тромбоцита ..... 282

**Е.А. Лаптева, Е.М. Кравченко, И.Д. Одарюк, В.С. Дорошкевич, О.В. Баранова**

Моделирование электронных спектров поглощения фенолов и продуктов их ферментативного окисления..... 288

**О.Р. Леденева, Е.В. Белова, В.С. Быстров**

Компьютерное моделирование структуры и физических свойств пептидных нанотрубок ..... 293

**С.В. Леонтьева**

Возбуждение красителей пиронина у и пиронина в водном растворе: сравнительный теоретический анализ ..... 301

**МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ****Е.С. Ястребова, Р.С. Владимиров**

Использование медицинского Nd:YAG лазера в безыгольной венепункции ..... 312

**Е.С. Ястребова, Т.А. Лагунов**

Влияние прохождения крови через капилляр на основные параметры эритроцитов ..... 319

**А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина**

Нестероидный противовоспалительный препарат мелоксикам ослабляет эффект иммуномодулятора глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки ..... 328

**М.А. Позднякова, Е.С. Жукова**

Особенности фотобиомодуляции при онкогенезе в зависимости от интенсивности окислительных процессов в организме крыс ..... 333

**R.A. Barrera Quiroz, A.A. Hernandez Santiago, B. Zenteno Mateo, M.A. Gonzalez Fuentes, A. Mendez Albores, E. Mendez Albores**

Сравнение фотодеградации мелатонина под воздействием солнечного света и ультрафиолетового излучения ..... 337

**В.В. Войнаровский, Г.Г. Мартинович**

Регуляция редокс-зависимого механизма адаптации эритроцитов наночастицами диоксида церия ..... 342

**БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ****М.И. Будник, С.Н. Сергеев, К.А. Тараскин, Л.М. Апашева, Р.А. Ростовцев, И.В. Ущановский, Н.В. Пролетова, А.В. Лобанов, А.Ф. Степнова, Г.З. Казиев, Е.Н. Овчаренко, Е.К. Барнашова, Л.А. Смурова, А.В. Грудзинский**

Новый научно-методический подход к экологической обработке семян льна, повышающей всхожесть и предотвращающей слипание посевного материала ..... 347

**М.С. Подольская, Э.С. Челебиева, О.Л. Гостюхина, Д.С. Лавриченко, Е.С. Кладченко**

Функциональное состояние *Magallana gigas* при заражении *Pione vastifica* ..... 353

## CONTENTS

### Volume 8, No. 3, 2023

#### *GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS*

**N.A. Kasyanenko, V.M. Bakulev, D.A. Artamonova**

Formation and study of multicomponent systems containing biologically active agents by spectral and hydrodynamic methods .....237

**L.N. Gall, T.E. Kuleshova, I.R. Gall**

Two forms of water structuring in the protoplasm of living cells and their role in bioenergetics ..... 242

**E.V. Fedotova, S.V. Paston**

Interaction of human serum albumin with cobalt ions and catechin ..... 248

**T.E. Kuleshova, P.V. Zhelnacheva, Z.A. Gasieva, A.S. Galushko, G.G. Panova**

Identification of potential-generating ions in the nutrient solution of bioelectrochemical system..... 258

**D.A. Nikitin, N.A. Kasyanenko, V.I. Rolich**

Complexes of iron (III) with catechin and their interaction with DNA .....265

**M.A. Suslov, Ju.V. Egorov, A.G. Daminova, A.V. Anisimov, D.V. Samigullin, A.R. Mustafina, O.D. Bochkova**

Using of paramagnetic fluorescent nanoparticles and spin-echo NMR for a comprehensive study of water transport in the roots of intact plants ..... 271

#### *MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS*

**I.N. Levchenko, G.K. Vladimirov, I.V. Volodyaev, Yu.A. Vladimirov**

Free radicals. Features of chemiluminescent activity of cytochrome C catalyst in complex with cardiolipin .....277

**A.L. Litvinenko, V.M. Nekrasov, E.S. Yastrebova**

Employing the optical model of an "oblate spheroid" to approximate the shape of an activated platelet ..... 282

**E.A. Lapteva, E.M. Kravchenko, I.D. Odaryuk, V.S. Doroshkevich, O.V. Baranova**

Simulation of the electronic absorption spectra of phenols and products of their enzymative oxidation..... 288

**O.R. Ledeneva, E.V. Belova, V.S. Bystrov**

Computer simulation of the structure and physical properties of peptide nanotubes..... 293

**S.V. Leontieva**

Excitations of pyronin y and pyronin B dyes in aqueous solution: comparative theoretical analysis .....301

**MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY****E.S. Yastrebova, R.S. Vladimirov**

Use of medical Nd:YAG laser in needless venipunction..... 312

**E.S. Yastrebova, T.A. Lagunov**

Influence of the blood flow through the capillary on the main parameters of erythrocytes..... 319

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

Non-steroid anti-inflammatory drug meloxicam attenuates the effect of immunomodulator glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in frog skin epithelium ..... 328

**M.A. Pozdnyakova, E.S. Zhukova**

Features of photobiomodulation during oncogenesis depending on the intensity of oxidative processes in the organism of rats .....333

**R.A. Barrera Quiroz, A.A. Hernandez Santiago, B. Zenteno Mateo,  
M.A. Gonzalez Fuentes, A. Mendez Albores, E. Mendez Albores**

Comparison of melatonin photodegradation between sunlight and UV irradiation .....337

**V.V. Voinarovski, G.G. Martinovich**

Regulation of the redox-dependent mechanism of erythrocyte adaptation by cerium dioxide nanoparticles..... 342

**BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES****M.I. Budnik, S.N. Sergeev, K.A. Taraskin, L.M. Apasheva, R.A. Rostovcev,  
I.V. Uschapovsky, N.V. Proletova, A.V. Lobanov, A.F. Stepnova, G.Z. Kaziev,  
E.N. Ovcharenko, E.K. Barnashova, L.A. Smurova, A.V. Grudzinsky**

A new scientific and methodological approach to the ecological processing of flax seeds, which increases germination and prevents the adhesion of seed material .....347

**M.S. Podolskaya, E.S. Chelebieva, O.L. Gostyukhina, D.S. Lavrichenko,  
E.S. Kladchenko**

Functional status of *Magallana gigas* infected by *Pione vastifica* .....353

## ФОРМИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ, СОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АГЕНТЫ, СПЕКТРАЛЬНЫМИ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Касьяненко Н.А., Бакулев В.М., Артамонова Д.А.

Санкт-Петербургский государственный университет

ул. Ульяновская, 1, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ, e-mail: [nkasyanenko@mail.ru](mailto:nkasyanenko@mail.ru)

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0615

**Аннотация.** В последнее время усилился интерес к использованию молекулы ДНК при конструировании новых систем для их применения в терапии различных заболеваний. При этом нуклеиновые кислоты используются не только как факторы влияния на организм на генетическом уровне (например, в качестве генных векторов), но и как инструменты для переноса различных биологически активных агентов в клетки-мишени. В этом случае речь идет об использовании высокомолекулярных ДНК. Важным этапом при создании таких структур является компактизация ДНК, обеспечивающая их проникновение через мембраны, а также защищающая ДНК от действия нуклеаз. В качестве компактизирующих агентов используют различные катионные полимеры. Включение в формируемые компактные ДНК-полимерные частицы наночастиц благородных металлов может расширить область применения таких структур в медицине за счет каталитических и оптических свойств наночастиц металлов. Целью данной работы стало изучение систем, сформированных путем компактизации ДНК с использованием синтетического полимера, сопряженного с наночастицами серебра. Рассматривается результат добавления в такие структуры люминесцирующего красителя. В работе для этой цели используется известный краситель этидиум бромид. Физико-химические свойства сформированных структур изучали методами вискозиметрии, УФ-спектрофотометрии, люминесцентной спектроскопии.

**Ключевые слова:** ДНК, наночастицы серебра, ДНК-полимерные частицы с включением красителя и наночастиц металла.

Нуклеиновые кислоты являются привлекательными объектами для терапевтического применения [1,2]. Лекарства на основе нуклеиновых кислот могут достигать долгосрочных эффектов, воздействуя на молекулярные основы заболеваний, связанных с повреждением ДНК. В частности, нуклеиновые кислоты могут быть использованы для создания различных структур, используемых в современной терапии рака [3]. Помимо генных векторов, к числу таких структур относят многофункциональные наноплатформы, содержащие различные компоненты, которые могут найти применение в тераностике. Действительно, молекула ДНК обладает такими свойствами, как превосходная биосовместимость, возможность самосборки различных конструкций, способность связывать различные биологически активные агенты. Помимо низкомолекулярных ДНК при создании лекарств иногда необходимо использовать высокомолекулярные образцы. Терапия на основе нуклеиновых кислот использует молекулы ДНК и их фрагменты не только для вмешательства в болезни на генетическом уровне, но и в качестве инструментов для доставки лекарств и других полезных объектов.

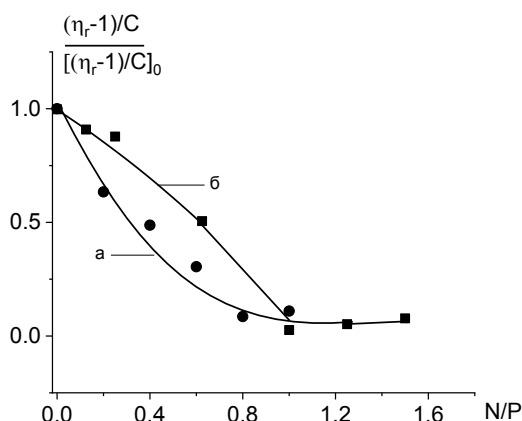
Терапевтическое использование природных нуклеиновых кислот затруднено их чувствительностью к нуклеазам и полиэлектролитными свойствами из-за их полианионной природы. Это можно минимизировать, переводя ДНК и ее комплексы в компактное состояние. Кроме того, эффективная доставка *in vivo* является ключом к клиническому применению препаратов на основе нуклеиновых кислот. Она также накладывает ограничения на размер структур, способных проникать через клеточные мембраны. Так как ДНК является сильно заряженной и жесткой макромолекулой, для решения проблемы ее компактизации *in vitro* обычно используют поликатионы, многовалентные ионы, полиамины.

Изучение многокомпонентных систем, сформированных при компактизации ДНК с включением наночастиц металлов и других компонентов, которые обладают биологической активностью, важно для понимания молекулярных основ формирования терапевтических и диагностических средств нового поколения.

Целью исследования являлось формирование и характеристика систем, содержащих высокомолекулярную ДНК, компактизирующий ее полимер, наночастицы благородных металлов (в работе используются наночастицы серебра) и этидиум бромид в качестве модельного люминофора.

Физико-химические свойства сформированных структур изучали методами ультрафиолетовой спектроскопии (спектрофотометр СФ-2000, Россия), вискозиметрии с использованием низкоградиентного ротационного вискозиметра типа Зимма-Крозера [4], флуоресцентной спектроскопии (спектрофлуориметр Hitachi F-7100). Использовали коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК тимуса телят фирмы Sigma Aldrich. Молекулярная масса образца была определена вискозиметрически по значению характеристической вязкости ДНК в 0,15 М NaCl [5] и составила  $12 \times 10^6$  г/моль. Соплимер МАГ-ДМАЭМ с включенными наночастицами серебра, синтезированный в ИВС РАН по методике, описанной в работе [6], был любезно предоставлен к.х.н. Назаровой О.В. Отношение мономерных звеньев полимера к  $\text{AgNO}_3$  при восстановлении серебра равно 9. Использовали краситель этидиум бромид, EtBr, соли NaCl,  $\text{NaNO}_3$  и  $\text{AgNO}_3$ , боргидрид натрия  $\text{NaBH}_4$  фирмы «Вектон».



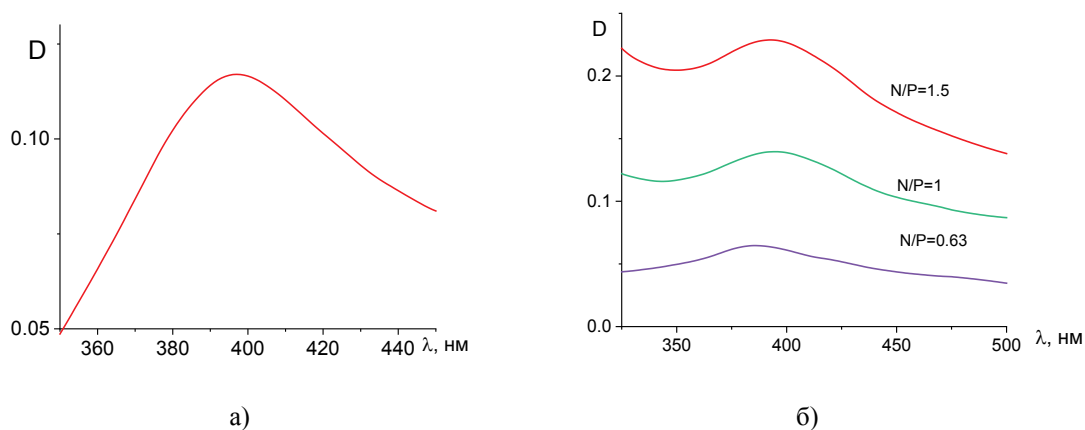


**Рисунок 1.** Зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК в 0,005 М NaNO<sub>3</sub> с сополимером (а) и сополимером, сопряженным с наночастицами серебра (б) от величины N/P. С(ДНК)=0,0066%

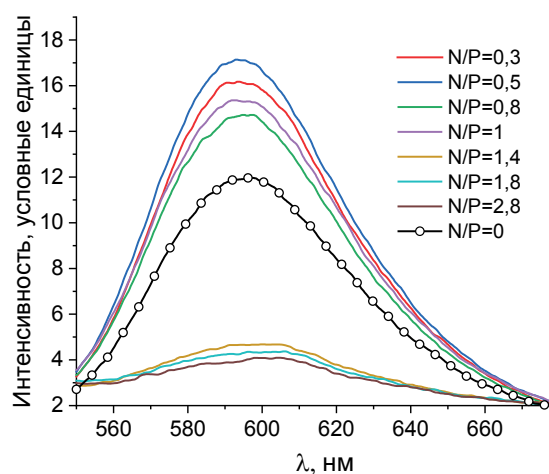
Для компактизации отрицательно заряженной ДНК и ее комплексов с заданными компонентами использовали катионные полимеры. Так как в основе формирования интерполиэлектролитных комплексов лежат электростатические взаимодействия, такие системы необходимо формировать в растворах малой ионной силы – в нашем случае мы использовали базовый раствор 0,005 М NaNO<sub>3</sub>. Компактизацию ДНК удобно рассматривать, используя метод вискозиметрии, так как изменение приведенной вязкости растворов ДНК отражает изменение объема ее молекулярного клубка. Из-за разницы в молекулярной массе (молекулярная масса полимера, оцененная по вязкости его растворов, составляла 15 000 г/моль) присутствие полимера в растворе не оказывало заметного влияния на измеряемую величину относительной вязкости раствора  $\eta_r = \eta/\eta_0$ , где  $\eta$  и  $\eta_0$  – вязкость раствора и растворителя соответственно. Измерения проводили при 21° С, градиенты скорости не превышали значения 2 см<sup>-1</sup>, что избавляло от необходимости измерения градиентной зависимости вязкости для используемых растворов. Величину относительной вязкости использовали для расчета приведенной вязкости раствора  $(\eta_r - 1)/C$ , где С – концентрация ДНК в растворе.

На рисунке 1 а приведена зависимость относительного изменения приведенной вязкости растворов ДНК с полимером без наночастиц от величины N/P, которая отражает отношения молярных концентраций ионогенных групп поликатиона и ДНК. Хорошо видно, что добавление катионного полимера в раствор ДНК приводит к падению приведенной вязкости растворов. При N/P=0.8 наблюдается полная компактизация макромолекулы. При использовании сополимера с наночастицами (рис. 1 б) общее падение приведенной вязкости ДНК от N/P и итоговая компактизация ДНК не изменились, что указывает на сохранение поликатионных свойств полимера после формирования наночастиц. Тем не менее, некоторая разница в ходе зависимости указывает на изменение электростатических взаимодействий при использовании сополимера с наночастицами, что и следовало ожидать.

Таким образом, при N/P>0.9 в растворах ДНК с сополимером, сопряженным с наночастицами, чрезвычайно малое значение приведенной вязкости отражает формирование компактных структур. Наличие наночастиц серебра в изучаемых растворах, как и в растворах сополимера без ДНК, проверяли по наличию пика плазмонного резонанса наночастиц серебра, появляющегося вне полос поглощения ДНК и полимера (рис. 2).



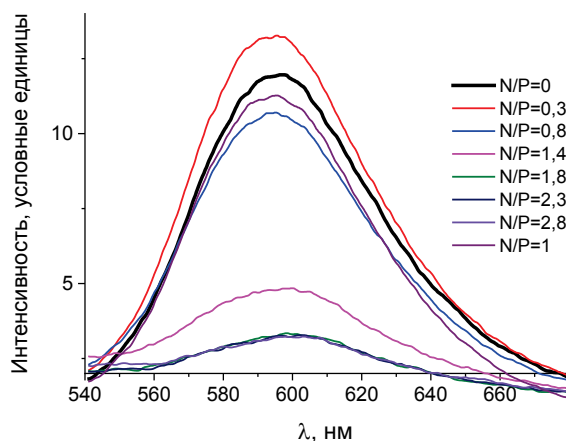
**Рисунок 2.** Пик плазмонного резонанса наночастиц серебра в растворах сополимера в 0,005 М NaNO<sub>3</sub> (а), С(пол)= 10<sup>-4</sup> М, и ДНК с сополимером в 0,005 М NaNO<sub>3</sub> (б) при разных значениях N/P. С(ДНК)=0,0035%



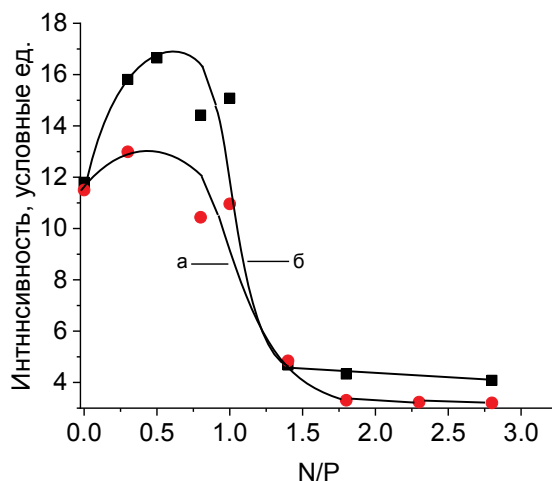
**Рисунок 3.** Спектр испускания флуоресценции красителя в растворах, содержащих разные концентрации сополимера или при разных значениях  $N/P$  (при постоянной концентрации ДНК) в  $0,005\text{ M NaNO}_3$  при  $\lambda_{\text{ex}}=500\text{ nm}$ . Сополимер добавляли в растворы, содержащие комплексы ДНК с красителем

Как известно, в окрестности наночастиц благородных металлов наблюдается усиление электромагнитного поля, что позволяет использовать композиты наночастиц с люминофорами при создании различных устройств. Для совмещения наночастиц с люминофорами удобно использовать связующие компоненты, которые обеспечивают сближение наночастиц с флуоресцирующими агентами. Если мы воспользуемся катионным сополимером, который связан с наночастицами (в нашем случае – наночастицами серебра), то из-за формирования интерполиэлектролитных комплексов с отрицательно заряженной молекулой ДНК в растворе компактные частицы будут содержать ДНК, полимер и наночастицы серебра. Предварительно связывая с ДНК флуоресцирующий краситель (в нашем случае - краситель EtBr) можно получить структуры, в которых краситель находится в непосредственной близости от наночастиц серебра. Так как эффект усиления оптических свойств соединений в композитах с наночастицами благородных металлов проявляется на расстоянии, не превышающем  $2\text{ nm}$ , можно ожидать, что такие наноструктуры проявят интересные оптические свойства.

Спектры флуоресценции красителя в комплексах с ДНК в растворах, содержащих  $0,005\text{ M NaNO}_3$  и сополимер с наночастицами при разных  $N/P$  показывают, что интенсивность люминесценции EtBr возрастает с увеличением  $N/P$  по сравнению с таковой без добавления сополимера (рис. 3). При проведении эксперимента краситель был связан с ДНК, после чего в раствор добавляли разные концентрации сополимера. Концентрации красителя и ДНК оставались постоянными. Несмотря на то, что краситель несет положительный заряд и частично экранирует заряд ДНК, положительно заряженный сополимер находит возможность связаться с ДНК и компактизировать ее. В результате компактизации ДНК краситель и наночастицы серебра сближаются, что приводит к тому, что интенсивность люминесценции красителя существенно возрастает с увеличением величины  $N/P$  от  $0$  до  $0,5$ . При  $N/P > 1$ , когда формируются компактные дискретные структуры, интенсивность люминесценции значительно падает.



**Рисунок 4.** Спектр люминесценции EtBr при его добавлении к комплексам ДНК с сополимером в  $0,005\text{ M NaNO}_3$  при  $\lambda_{\text{ex}}=500\text{ nm}$



**Рисунок 5.** Зависимость амплитуды полосы испускания при 600 нм от отношения N/P для комплексов красителя с ДНК в 0,005 М NaNO<sub>3</sub> при добавлении сополимера в раствор ДНК до и после добавления красителя,  $\lambda_{ex}=500$  нм

Если краситель добавлять в раствор ДНК после ее связывания с сополимером, наблюдается другой результат (рис. 4). Несмотря на то, что при  $N/P=0,3$  также фиксируется увеличение интенсивности люминесценции, что можно объяснить эффектом влияния наночастиц серебра, это увеличение не столь значительно, как в описанном выше эксперименте при другом порядке добавления компонентов в раствор ДНК.

В остальных растворах интенсивность люминесценции снижается – в этом случае для красителя после формирования интерполиэлектrolитных комплексов затруднен доступ к ДНК, которая находится в составе компактных частиц. На рис. 5 представлены результаты обработки спектров, приведенных на рисунках 3 и 4. Хорошо видно, что при проведении эксперимента порядок добавления сополимера в раствор ДНК при формировании ее комплексов с красителем играет важную роль.

Таким образом, в работе показано, что использование катионного сополимера МАГ-ДМАЭМ с включенными наночастицами серебра для компактизации ДНК в растворе малой ионной силы (0,005 М NaNO<sub>3</sub>) приводит к формированию интерполиэлектrolитных комплексов с включением наночастиц серебра. При этом компактизация ДНК принципиально не отличается от наблюдаемой при использовании такого же сополимера без наночастиц. Иными словами, сопряженные с сополимером наночастицы серебра компактизации ДНК в растворах малой ионной силы не мешают.

При исследовании люминесценции EtBr в связанном с ДНК состоянии после формирования интерполиэлектrolитных комплексов ДНК с сополимером с включением серебряных наночастиц зарегистрировано увеличение интенсивности люминесценции красителя. При  $N/P>1$  интенсивность люминесценции падает по сравнению с таковой для растворов, содержащих комплексы ДНК с красителем без сополимера.

Порядок добавления красителя и сополимера с наночастицами серебра в раствор ДНК влияет на эффект усиления люминесценции этидиума бромиды. Компактизация ДНК, предшествующая добавлению красителя в раствор, затрудняет доступ молекулам красителя к местам его связывания с ДНК.

#### Список литературы / References:

1. Lv Z., Zhu Yi., Li F. DNA Functional Nanomaterials for Controlled Delivery of Nucleic Acid-Based Drugs. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, vol. 9, p. 720291, doi: 10.3389/fbioe.2021.720291.
2. Bege M., Borbás A. The Medicinal Chemistry of Artificial Nucleic Acids and Therapeutic Oligonucleotides. *Pharmaceuticals*, 2022, vol. 15, p. 909, doi: 10.3390/ph15080909.
3. Wu X., Wu T., Lu J., Ding B. Gene therapy based on nucleic acid nanostructure. *Adv. Healthc. Mater.*, 2020, vol. 9, e2001046, doi: 10.1002/adhm.202001046.
4. Frisman E.V., Schagina L.V., Vorobiev V.I. A glass rotation viscometer. *Biorheology*, 1965, vol. 2, pp. 189-194.
5. Eigner J., Doty P. The native, denatured and renatured states of deoxyribonucleic acid. *Journal of Molecular Biology*, 1965, vol. 12, pp. 549-580, doi: 10.1016/S0022-2836(65)80312-6.
6. Shvedchenko D.O., Nekrasova T.N., Nazarova O.V., Buffat P.A., Suvorova E.I. Mechanism of formation of silver nanoparticles in MAG–DMAEMA copolymer aqueous solutions. *J Nanopart Res*, 2015, vol. 17, pp. 1-13, doi: 10.1007/s11051-015-3083-5.

**FORMATION AND STUDY OF MULTICOMPONENT SYSTEMS CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS BY SPECTRAL AND HYDRODYNAMIC METHODS****Kasyanenko N.A., Bakulev V.M., Artamonova D. A.**

Saint-Petersburg State University

*Ulyanovskaya str., 1, Saint Petersburg, 198504, Russia, e-mail: nkasyanenko@mail.ru*

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0615

**Abstract.** The usage of the DNA molecule in the design of new systems for their application in the therapy of various diseases has generated a lot of interest recently. Nucleic acids are used not only as factors of the influence on sick organism at the genetic level (for example, as gene vectors), but also as tools for the transfer of various biologically active agents into target cells. The high-molecular DNA can be applied in this case. An important step in the creation of such structures is DNA packaging. It ensures the penetration of DNA structures through membranes and also protects DNA from the action of nucleases. Various cationic polymers are used as compacting agents. Inclusion of noble metal nanoparticles into compact DNA-polymer structures can expand the scope of such constructions in medicine due to the catalytic and optical properties of metal nanoparticles. The aim of this work was to study the properties of the systems formed by DNA compaction using a synthetic polymer conjugated with silver nanoparticles. The result of adding a luminescent dye to such structures is considered. In this work, the well-known dye ethidium bromide is used for this purpose. The physicochemical properties of the formed structures were studied by viscometry, UV spectrophotometry, and luminescence spectroscopy.

**Key words:** *DNA, silver nanoparticles, DNA-polymer particles with inclusion of a dye and metal nanoparticles.*

## ДВЕ ФОРМЫ СТРУКТУРИРОВАНИЯ ВОДЫ В ПРОТОПЛАЗМЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК И ИХ РОЛЬ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ

Галль Л.Н.<sup>1</sup>, Кулешова Т.Э.<sup>1,2</sup>, Галль И.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт аналитического приборостроения РАН

ул. Ивана Черных 31-33, г. Санкт-Петербург, 198095, РФ; e-mail: lngall@yandex.ru

<sup>2</sup> Агрофизический научно-исследовательский институт

Гражданский проспект 14, г. Санкт-Петербург, 195220, РФ

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0616

**Аннотация.** Статья посвящена экспериментальному подтверждению особенностей состояния воды в цитоплазме живых растительных клетках, и установлению роли этого состояния в физиологии. Под состоянием воды далее будем понимать структурную организацию водной компоненты цитоплазмы клетки, в значительной степени определяющую физико-химические свойства цитоплазмы и механизм квантовой биоэнергетики живого организма. Изучение водной среды живой клетки показывает, что она является коллоидной средой, организованной по двум различным механизмам. Первый из них - континуальное подвижное жидкое состояние, в котором водная среда цитоплазмы локально напряжена растворенными в ней клеточными элементами: органеллами, биополимерами, малыми биомолекулами и ионами, в основном –  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Второе – малоподвижное, отвечающее самоорганизации молекул воды на гидрофильных центрах биополимеров в фракталоподобные энергонапряженные стержневые структуры, предсказанное в теории Бульenkова. Эта форма структурирования воды является основой образования молекулярно-водной системы любого живого организма - главного вещественного элемента биоэнергетики. В данной работе существование обоих типов структурирования воды в цитоплазме показано методом спектральной L-диэлькометрии в эксперименте с листьями хлорофитума в условиях искусственной засухи.

**Ключевые слова:** протоплазма клетки, структурирование воды, биоэнергетика, L-диэлькометрия, искусственная засуха.

**Постановка задачи.** Ни один живой организм не может развиваться без обеспечения энергией молекулярных систем его клеток. Изучение биоэнергетики клетки является главным условием в развитии ее физиологии, общая задача которой – выявление *причинно-следственных* связей в функционировании как клетки, так и живого организма в целом. В свою очередь эти связи в живом организме в обязательном порядке увязаны с его биоэнергетикой, понимаемой не только как система биохимических процессов зарядки энергией молекул АТФ, но и как способы доставки энергии к молекулярным системам клеток, и как физические законы управления энергетикой межмолекулярных и межклеточных процессов. Поскольку все энергетические процессы развиваются в цитоплазме клетки и в межклеточной среде, изучение этих сред живого и выявление подлинной роли их водной составляющей становится главным вопросом проблемы биоэнергетики, т.е. энергетики живых клеток и организмов. При этом изучение состояния воды в живых клетках в процессе протекания физиологических реакций, в том числе – в условиях стресса, на данный момент остается нерешенной задачей, вызывающий постоянный интерес физиологов.

Водная среда живой клетки, то есть цитоплазма, это совершенно особая водная коллоидная система с необычными свойствами, существующими только в молекулярных системах живого. В ней присутствуют все возможные формы структурирования молекул воды, создаваемые примесями, находящимися в этой водной среде. Они в такой степени искажают структуру исходной воды, что эта водная система уже не может называться раствором, поскольку «свободной воды», структура которой не искажена каким-либо физико-химическим процессом, вызванным примесями, в цитоплазме нет вообще. Соответственно, физико-химической моделью цитоплазмы живой клетки является многокомпонентная система на основе воды, молекулы которой связаны со всеми присутствующими в ней химическими соединениями – гетероструктурными биополимерами, гидрофильными и гидрофобными биомолекулами, положительно и отрицательно заряженными ионами, молекулами не диссоциировавших солей, наночастицами и другими неорганическими соединениями, в связи с чем водная среда цитоплазмы является коллоидной средой, полностью измененной по сравнению с исходной структурой жидкой воды [1].

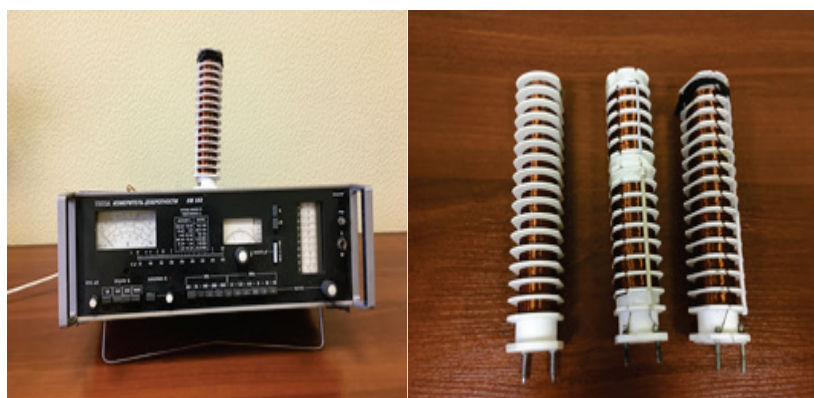
Результаты теоретических работ [2-4] позволяют считать полностью обоснованным представление о биополимере в водной среде как об энергетической машине – источнике квантов электромагнитного поля – солитонов [2], способствующих специфическому структурированию водной среды, примыкающей к биополимеру [3,4]. Теория Бульenkова [5] позволила описать это структурирование в рамках представлений об электростатической организации молекулы воды. Симметричная рассредоточенность зарядовых центров этой молекулы и ее большой дипольный момент обеспечивают образование молекулами воды не только различных аномалий свойств ее жидкой фазы, но и постоянную самоорганизацию в ней фракталоподобных энергонапряженных стержневых структур, установленную и описанную в [6]. На возможность образования в живых клетках структур воды, растущих на биополимерах и отличных от структур, характерных для цитоплазмы,

в своих работах уже указывал Д.Александр [3], обсуждая результаты гидратации биополимеров, однако прямых экспериментальных доказательств образования структур типа фрактальных квазикристаллических цепей ранее не было представлено. Доказательство их существования имеет принципиальное значение для обоснования модели биоэнергетики [7], базирующейся на теоретических работах [2-4]. Соответственно, целью данной работы было прямое экспериментальное подтверждение существования в живых клетках механизма структурирования воды на биополимерах при их гидратации, для чего была предложена и реализована методика измерения методом спектральной L-диэлькометрии спектров тангенса диэлектрических потерь водной компоненты в листьях растений в процессе их искусственной засухи.

**Экспериментальная часть.** Метод L-диэлькометрии относится к совокупности радиоспектроскопических методов исследования строения вещества, а также физических и химических процессов в нём, основанных на резонансном поглощении электромагнитного поля. Физический механизм любого метода радиоспектроскопии аналогичен хорошо известной спектрофотометрии: если частота электромагнитной волны, падающей на некоторое вещество или сложную молекулярную систему, близка или совпадает с одной из собственных частот внутрисистемных колебаний, на этой частоте можно зафиксировать поглощение электромагнитной энергии. Соответственно, при изменении частоты можно наблюдать спектр пиков, указывающий частоты, на которых происходит поглощение энергии, и тем самым зафиксировать спектр внутримолекулярных или внутрисистемных колебаний. Физический смысл такого спектра состоит в том, что по нему можно получить информацию о строении молекулы, о растворе или о молекулярной системе. Диэлькометрия позволяет проводить такие исследования водных растворов в диапазоне частот  $10^4$ - $10^6$  Гц, в котором проявляются внутрисистемные колебания гидратов молекул, позволяющие определить энергии межмолекулярных напряжений структурированной водной среды. Этот частотный диапазон крайне сложен для исследований водных растворов, поскольку для большинства реализаций радиоспектроскопических методов предполагаемые эффекты оказываются недоступными для измерений из-за высокой проводимости растворов. Исключением является метод низкочастотной индуктивной диэлькометрии (L-диэлькометрии) [8], в котором для снижения влияния проводимости исследуемый объект размещается не в емкости, а в катушке индуктивности колебательного контура, являющейся как источником поля, действующего на объект исследования, так и элементом измерительной системы.

В методе L-диэлькометрии присутствие структур воды устанавливается по спектру тангенса диэлектрических потерь ( $\text{tg}\delta$ ), изменяющегося при изменении частоты ЭМП, задаваемой генератором колебательного контура, причем величина  $\text{tg}\delta$  вычисляется непосредственно из величин, измеряемых в эксперименте: параметров резонанса контура как без пробы [8], так и с пробой, внесенной в пробирку в соленоид контура. Для проведения измерений с растворами низких концентраций на основе измерителя добротности VM-560 фирмы Тесла была разработана установка и были разработаны катушки индуктивности L с минимальными величинами собственной индуктивности, емкости и сопротивления.

Разработка оптимальных катушек позволила существенно увеличить чувствительность метода, что в свою очередь дало возможность выявить спектральный характер изменения тангенса диэлектрических потерь  $\text{tg}\delta$  измеряемого раствора [9]. Куметр VM-560 построен на аналоговой электронике, что в данном случае очень удобно для точной настройки его режима в резонанс на задаваемой частоте. Настройка производится с помощью изменения величины высокоточной настроечной емкости C до достижения резонанса, и параметры резонанса считываются непосредственно с приборов, установленных на лицевой панели куметра. Этими параметрами являются величина добротности контура Q и величина настроечной емкости C. При измерении на каждой установленной частоте f они измеряются вначале – при отсутствии пробы в катушке индуктивности L, а затем – при введении в катушку пробирки с пробой. Именно эти величины –  $Q_1, C_1$  - без пробы, и  $Q_2, C_2$  – с пробой, затем используются для вычисления тангенса диэлектрических потерь в измерении на данной частоте f, а именно  $\text{tg}\delta = (Q_1 C_1 - Q_2 C_2) / Q_1 Q_2 (C_1 - C_2)$ .



**Рисунок 1.** Внешний вид куметра VM-560 и три катушки с разными величинами индуктивности, позволяющие использовать диапазон частот 50КГц-1МГц

Этим методом при исследовании водных растворов солей металлов первой и второй групп и молекул биоактивных веществ было ранее показано [10], что в спектрах солей положение пиков на шкале частот зависит только от химической природы катиона или аниона, и что растворы биоактивных веществ образуют в растворах долгоживущие молекулярно-водные комплексы. Во всех случаях только присутствие воды в пробе позволяло получать спектральные зависимости  $\text{tg}\delta$  от частоты: для сухих образцов диэлектрические потери не наблюдались.

В данном исследовании для получения информации о водных структурах цитоплазмы растения была использована методика искусственной засухи.

В качестве фитотест-объекта были выбраны растения хлорофитума (*Chlorophytum Ker Gawl.*). Измерения проводились следующим образом. Зеленая масса свежесрезанных листьев хлорофитума, известного своей засухоустойчивостью, взвешивалась, а затем помещалась в пробирку и проводилось измерение спектра  $\text{tg}\delta$  в частотном диапазоне 100-600 КГц. После каждого измерения листья извлекались из пробирки и выдерживались на воздухе для подсушивания, после чего перед новым измерением потери воды определялись взвешиванием. Затем растения вновь помещались в пробирку и измерение  $\text{tg}\delta$  повторялось. Эта процедура выполнялась до полного высыхания растений, которое для листьев хлорофитума составляло более месяца. На рисунке 2 приведен участок такого спектра в диапазоне частот 100-1300 КГц, при потере 50% воды, демонстрирующий сложный спектральный состав зависимости тангенса диэлектрических потерь ( $\text{tg}\delta$ ) от частоты. Такой спектр вполне отражает факт структурирования молекул воды цитоплазмы клеток листьев хлорофитума, но он не информативен для идентификации наблюдаемых пиков.

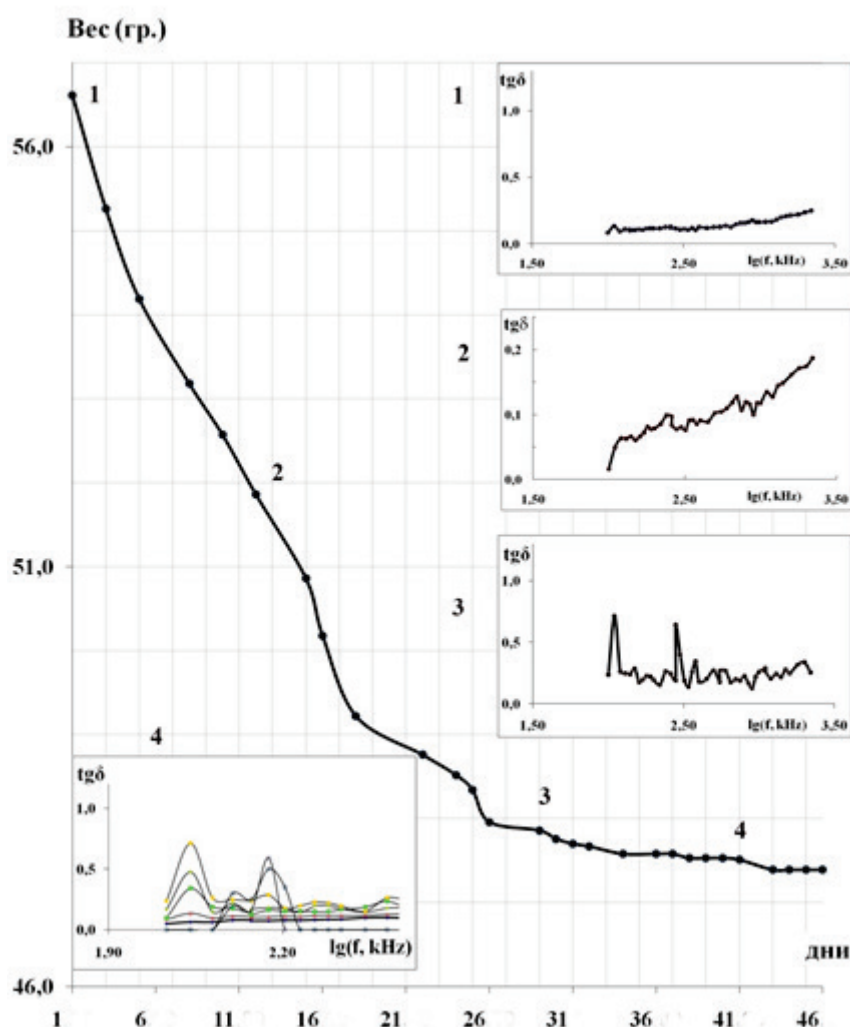
Далее на рисунке 3 представлена обобщенная картина последовательных изменений спектра  $\text{tg}\delta$  при изменении количества воды в цитоплазме и в межклеточном пространстве листьев хлорофитума.

Изменение интенсивности и числа пиков в спектре зависимости тангенса диэлектрических потерь от частоты ЭМП для модельного растения, каковым в данном эксперименте выступает хлорофитум, при уменьшении количества воды в листьях в условиях искусственной засухи демонстрирует изменение условий структурирования и самоорганизации водной компоненты растения. При сохранении достаточного количества воды - спектры 1, 2 и 3 демонстрируют изменение формы спектра, отвечающее увеличению концентрации ионов, малых молекул и других примесей в цитоплазме при засухе, однако для идентификации пиков при этом информации в спектрах недостаточно. Информативным является только спектр, отвечающий почти полному высыханию воды, кусочек которого приведен на рис.3 под номером 4. На этом спектре четко выделяются две группы пиков. Первая - на частоте  $f=110$  КГц, ранее [10] была идентифицирована, как структура воды, образованная ионом  $\text{Na}^+$ . Пики этой группы растут при приближении количества воды к полному высыханию, с затем полностью исчезают в спектре, что свидетельствует о полном высыхании воды в цитоплазме. Пики второй группы (на частоте  $f=190$  КГц) в это время хоть и вполне заметны, но изменяются мало. Но они присутствуют в спектре еще 8 дней, до тех пор, пока изменение веса листьев становится менее одного процента. Тогда они вдруг четко определяются, возрастают, и затем также исчезают. Эти результаты можно трактовать только как демонстрацию присутствия в листьях структур воды двух разных типов: напряженных ионами - в цитоплазме, и стержневых квазикристаллических - между гидрофильными центрами биополимеров. Они полностью коррелируют с опубликованными Казанской школой физиологов результатами, полученными методом импульсного ЯМР [11]. Авторами этих работ было показано существование в живом растении двух типов водных структур: подвижной и малоподвижной, причем последняя переходила от клетки к клетке.

На наш взгляд, «малоподвижные» структуры воды - это структуры, которые образуются и «растут» на гидрофильных центрах биополимеров при их гидратации. Их рост и устойчивость стимулируются тем, что водородные связи гидрофильных центров биополимеров ( $\text{N}-\text{H}\cdots$ ,  $\text{O}-\text{H}\cdots$ ,  $\text{S}-\text{H}\cdots$ ), связываясь с молекулами воды, растягивают ковалентные связи атомов этих групп, увеличивая их жесткость и превращая их в осцилляторы солитонов. Именно эти процессы были впервые установлены и обоснованы в теоретико-экспериментальных



Рисунок 2. Типовой спектр листьев хлорофитума при уменьшении количества воды цитоплазмы на 20%



**Рисунок 3.** Изменения спектра  $\text{tg}\delta$  по мере высыхания листьев: 1 – свежесрезанные листья; 2 – 50% потери веса; 3 – 95% потери веса; 4 – первая группа пиков: потеря веса от 98,4% до 99,6%; вторая группа пиков от 99,6% до 100%

работах [3,4]. А благодаря работам Бульenkова и Желиговской [5,6] эти водные структуры теоретически описаны и показана их главная особенность: они являются энергонапряженными, т.е. их длительное существование возможно именно в живых клетках, в которых они постоянно поддерживаются энергией солитонов. Образуя, совместно с биополимерами, молекулярно-водную структуру живой клетки, эти водные одномерные мосты являются важнейшей частью биоэнергетики и функционирования любого живого организма. При этом структуры воды, входящие в молекулярно-водные системы живых растений, будучи достаточно прочными, вполне возможно, выступают одним из элементов, определяющим засухоустойчивость растения.

**Заключение и выводы.** Таким образом, результаты, полученные методом низкочастотной спектральной L-диэлькометрии высокого разрешения, и поддержанные результатом, полученным методом импульсного ЯМР, совместно интерпретированные на основе современных теоретических представлений о структурировании воды ионами (электростатическое напряжение структуры воды) и гидрофильными центрами биополимеров, позволяют сделать следующие общие выводы.

1. Вода в цитоплазме живых растений структурирована по двум различным механизмам, первый из которых определяет состояние цитоплазмы как коллоидной системы, а второй является ранее не известным структурированием воды на гидрофильных центрах биополимеров, приводящим к образованию его цельной молекулярно-водной системы.

2. Методика искусственной засухи является крайне эффективной в исследованиях состояния воды при выявлении засухоустойчивых и морозоустойчивых растений.

3. Подтверждение образования устойчивых структур воды, выдерживающих длительное обезвоживание растений, является не только важным фитофактором, но также и экспериментальным подтверждением теории Н.А. Буленкова о структурировании воды на гидрофильных центрах биополимеров в энергонапряженные квазифрактальные структуры.



**Список литературы / References:**

1. Лященко А.К., Дуняшев В.С. *Пространственная структура воды. Сб. «Вода: структура, состояние, сольватация. Достижения последних лет».* Коллективная монография: Отв. ред. А.М.Кутепов. М.: Наука, 2003, 404 с. [Lyashchenko A.K., Duniyashov V.S. *Spatial structure of water. Sat, "Water: structure, state, solvation. Achievements of recent years. Collective monograph: Otv. ed. A.M. Kutevov. M.: Nauka, 2003, 404 p. (In Russ.)*].
2. Давыдов А.С. *Солитоны в молекулярных системах.* Киев. Наукова думка, 1984, 282 с. [Davydov A.S. *Solitons in molecular systems.* Kyiv. Naukova Dumka, 1984, 282p. (In Russ.)].
3. Alexander D.M., Krumhansl J.A. *Localized excitations in hydrogen-bonded molecular crystals.* *Phys. Rev. B*, 1986, vol. 33, pp. 7172-7185.
4. DelGiudice E., Doglia S., Milani M., Vitiello G. A quantum field theoretical approach to the collective behavior of biological system. *Nuclear Physics B251*, 1985, vol. FS 13, pp. 375-400.
5. Бульенков Н.А. Роль модульного дизайна в изучении процессов системной самоорганизации. *Биофизика*, 2005, т. 50, № 5, с. 620-664. [Bul'enkov N.A. The role of modular design in the study of system self-organization processes. *Biophysics*, 2005, vol. 50, no. 5, pp. 620-664 (In Russ.)].
6. Желиговская Е.А., Бульенков Н.А. Стержневые структуры связанной воды: их возможная роль в самоорганизации биологических систем и недиссипативной передаче энергии. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 5, с. 837-845 [Zheligovskaya E.A., Bul'enkov N.A. Rod structures of bound water: their possible role in the self-organization of biological systems and non-dissipative energy transfer. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 837-845 (In Russ.)].
7. Галль Л.Н. *Квантовая биоэнергетика живых клеток и организмов.* VII Съезд биофизиков России, Краснодар, апрель 2023, Тезисы докладов, с. 346. [Gall L.N. *Quantum bioenergetics of living cells and organisms.* VII Congress of Biophysicists of Russia, Krasnodar, April 2023, Abstracts, p. 346 (In Russ.)].
8. Семихина Л.П. *Диэлектрические и магнитные свойства воды в водных растворах и биообъектах в слабых электромагнитных полях.* Монография, Тюмень, ТГУ, 2006. [Semikhina L.P. *Dielectric and magnetic properties of water in aqueous solutions and biological objects in weak electromagnetic fields.* Monograph, Tyumen, TSU, 2006 (In Russ.)].
9. Галль Л.Н., Максимов С.И., Скуридина Т.С., Галль Н.Р. Низкочастотная индуктивная диэлькометрия – информативный метод для изучения структурирования воды в водных растворах. *Научное приборостроение*, 2016, т. 26, № 1, с. 19-24 [Gall L.N., Maksimov S.I., Skuridina T.S., Gall N.R. Low Frequency inductive dielcometry – informative method for the study of the structuring water in aqueous solutions. *Nauchnoe Priborostroenie*, 2016, vol. 26, no. 1, pp. 26-33, doi: 10.18358/np-26-1-i2633 (In Russ.)].
10. Галль Л.Н., Бердников А.С., Галль Н.Р., Максимов С.И., Галль И.Р. Структурные изменения и появление элементных пиков в низкочастотных спектрах диэлькометрического поглощения разбавленных водных растворов электрлитов. *ЖФХ*, 2022, т. 96, № 7, с. 983-988 [Gall L.N., Berdnikov A.S., Gall N.R., Maksimov S.I., Gall I.R. Structural changes and the appearance of elemental peaks in low-frequency spectra of dielcometric absorption of dilute aqueous solutions of electrlites. *ZhFH*, 20223, vol. 96, no. 7, pp. 983-988, doi: 10.31857/S0044453722070135 (In Russ.)].
11. Хохлова Л.П., Бочкарева М.А. Водный обмен растений: итоги ЯМР исследований. *Ученые записки Казанского государственного университета*, 2009, т. 151, № 4, с. 73-103. [Khokhlova L.P., Bochkareva M.A. Water exchange of plants: results of NMR research. *Uchenye zapiski Kazanskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2009, vol. 151, no. 4, p. 73-103 (In Russ.)].

**TWO FORMS OF WATER STRUCTURING IN THE PROTOPLASM OF LIVING CELLS AND THEIR  
ROLE IN BIOENERGETICS****Gall L.N.<sup>1</sup>, Kuleshova T.E.<sup>1,2</sup>, Gall I.R.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences  
*Ivan Chernykh str. 31-33, St. Petersburg, 198095, Russia; e-mail: lngall@yandex.ru*<sup>2</sup>Agrophysical Research Institute*Grazhdansky Prospekt 14, St. Petersburg, 195220, Russia*

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0616

**Abstract.** The article describes experimentally confirmed peculiarities of the state of water in the cytoplasm of living plant cells, and offers a compelling explanation of its role. Under the “state of water” we mean structural organization of the water component of a cell’s cytoplasm, which largely determines physical and chemical properties of water and its role in bioenergetics’ mechanisms of living systems. Studying the aquatic environment of a living cell shows that it is organized according to two different mechanisms. The first one is a continual mobile liquid state, locally stressed by cell organelles, biopolymers and ions dissolved in the aquatic environment of the cytoplasm, mainly Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>. The second one is inactive, corresponding to self-organization of water molecules on the hydrophilic centers of biopolymers into fractal-like energy-intensive rod structures, predicted by Bul'enkov's theory. This form of water structuring is the basis for the formation of the molecular water system in any living organism – bioenergetics’ main material element. In the current study, existence of both types of water structuring in living plant cells was determined by an experiment with chlorophytum leaves which were observed under conditions of artificial drought. The experiment was carried out with the use of L-dielcometry method.

**Key words:** *cell protoplasm, water structuring, bioenergetics, L-dielcometry, artificial drought.*

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С ИОНАМИ КОБАЛЬТА И КАТЕХИНОМ

Федотова Е.В., Пастон С.В.

Санкт-Петербургский государственный университет

ул. Ульяновская, д. 1-3, Петергоф, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ; e-mail: st077318@student.spbu.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0617

**Аннотация.** В работе изучается структура человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в водных растворах в присутствии катехина при постоянном молярном соотношении  $[ЧСА]:[Cat]=1:10$  и варьировании концентрации ионов кобальта в пределах  $[Co^{2+}]:[ЧСА]$  от 0 до 100. Исследование вторичной структуры белка проводится методом ИК Фурье спектроскопии с деконволюцией полосы Амид I. Изменения в третичной структуре белка фиксируются по спектрам УФ поглощения и флуоресценции. Обнаружено, что при соотношениях концентраций  $[ЧСА]:[Co^{2+}]$  до 1:100 не происходит нарушений в глобулярной структуре белка. Наблюдается снижение количества  $\alpha$ -спиралей и увеличение содержания  $\beta$ -слоев в структуре белка с ростом концентрации катионов кобальта. При взаимодействии ЧСА с катехином наблюдаются спектральные изменения, свидетельствующие об образовании комплекса. Предположительно, комплексообразование приводит к тушению флуоресценции обоих соединений. Причиной тушения флуоресценции белка может быть как нарушение его третичной структуры, так и непосредственное связывание катехина и катионов кобальта с ЧСА вблизи ароматических аминокислотных остатков. Величина дзета-потенциала частиц белка в растворе, определяемая плотностью отрицательного заряда на ЧСА, снижается с ростом концентрации  $CoCl_2$  в растворе, приближаясь к 0 при  $[Co^{2+}]:[ЧСА]=100$ . Катехин не препятствует комплексообразованию ЧСА с  $Co^{2+}$ .

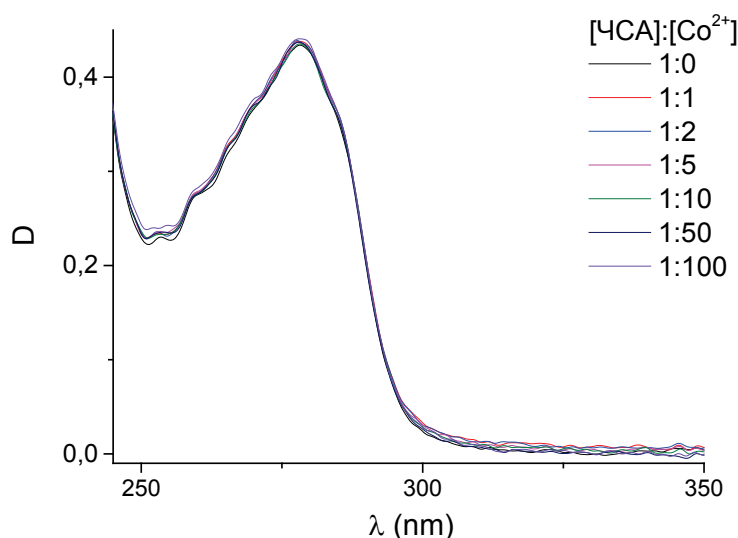
**Ключевые слова:** сывороточный альбумин человека, ионы металлов, катехин, комплексообразование, вторичная структура белка, собственная флуоресценция белка.

Ионы металлов широко распространены в природе и могут проникать в организм человека через воздух, почву, пищу и многими другими путями. Из-за того, что ионы металлов не могут разлагаться в окружающей среде, низкие концентрации ионов металлов могут накапливаться по пищевой цепочке, а затем становиться высокотоксичными для живых организмов [1]. При попадании в кровь, ионы металлов связываются с анионными группами белков плазмы, в том числе с сывороточным альбумином человека (ЧСА). Также они могут образовывать координационные связи с сульфгидрильными группами. Таким образом, путем присоединения к сывороточным белкам или путем изменения их конформации, ионы металлов способны конкурировать с экзогенными веществами за связывание с сывороточными белками [2]. Кроме того, существуют данные о том, что взаимодействие ионов переходных металлов с белками может провоцировать образование гидрофобных агрегатов, являющихся предшественниками амилоидов. Эти процессы инициируют развитие целого ряда конформационных болезней, в частности, нейродегенеративных патологий (например, болезнью Альцгеймера, Паркинсона, прионных болезней) [3,4].

Катехины – полифенолы растительного происхождения, присутствующие в повседневном рационе человека. Они обладают множеством полезных для организма свойств, в частности, проявляют антиоксидантную активность [5]. Молекулы катехинов могут участвовать в образовании координационной связи, являясь донором электронов для ионов переходных металлов, а также, благодаря своим восстановительным свойствам, менять степень окисления иона. Недавно появились исследования, обнаруживающие способность полифенолов ингибировать агрегацию амилина и альбумина, и даже вызывать разрушение уже образовавшихся фибрилл [6-8]. Эти весьма обнадеживающие результаты позволяют рассматривать полифенолы как основу для создания препаратов для профилактики и лечения конформационных болезней. В данной работе исследуется структура сывороточного альбумина человека при взаимодействии с ионами кобальта (II) и катехином.

Для исследования вторичной структуры белка широко используется метод ИК Фурье спектроскопии [9,10]. Наиболее чувствительной к различным формам вторичной структуры белка спектральной областью является полоса Амид I ( $1700-1600\text{ см}^{-1}$ ), которая почти полностью обусловлена колебаниями C = O пептидных связей. Количественная оценка вторичной структуры белка основана на предположении, что любой белок может рассматриваться как линейная сумма нескольких элементов вторичной структуры, каждый из которых вносит свой вклад в определённом диапазоне волновых чисел в колебания пептидной связи. Разложение полосы Амид I на составляющие гауссовы контуры позволяет оценить содержание в данном белке различных элементов вторичной структуры [11]. В данной работе ИК спектры растворов альбумина регистрировали на приставке НПВО ИК Фурье спектрометра Nicolet 8700 (Thermo Scientific) с разрешением  $2\text{ см}^{-1}$ . Анализ спектров проводился с помощью программы Origin Pro.

Информацию о состоянии третичной структуры белка даёт исследование спектров поглощения и собственной флуоресценции белка. Поглощение в ближнем УФ диапазоне ЧСА обусловлено, в основном, ароматическими аминокислотными остатками Trp (1), Tyr (18) и Phe (31), флуоресцирует в основном Trp [12,13].



**Рисунок 1.** Спектры поглощения двухкомпонентных систем ЧСА с  $\text{Co}^{2+}$ . Соотношения соединений указаны на рисунке

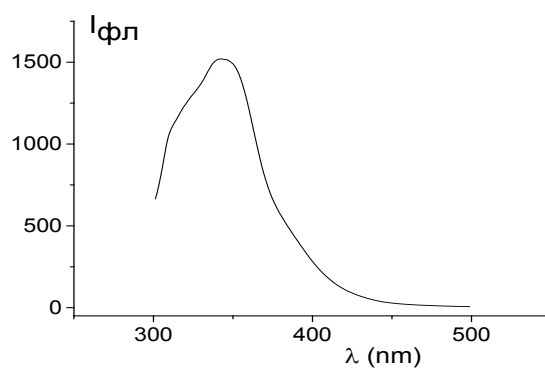
Спектральные параметры ароматических аминокислот весьма чувствительны к их ближайшему окружению, и увеличение контактов с полярными молекулами воды вследствие нарушения глобулярной структуры приводит к заметному изменению спектров поглощения и флуоресценции ЧСА [12,14]. Спектры поглощения растворов белка регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия), спектры флуоресценции на приборе HITACHI F-7100 под  $90^\circ$ . Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см, измерения проводили при температуре 20-22°C.

Для характеристики поверхностного заряда белковых частиц применяли метод дзета-потенциала. Измерения проводили с помощью лазерного анализатора размера частиц SZ100 (Horiba Jobin Yvon) в термостатируемой камере при 25°C, использовали лазер с длиной волны 532 нм, мощностью 10 мВт.

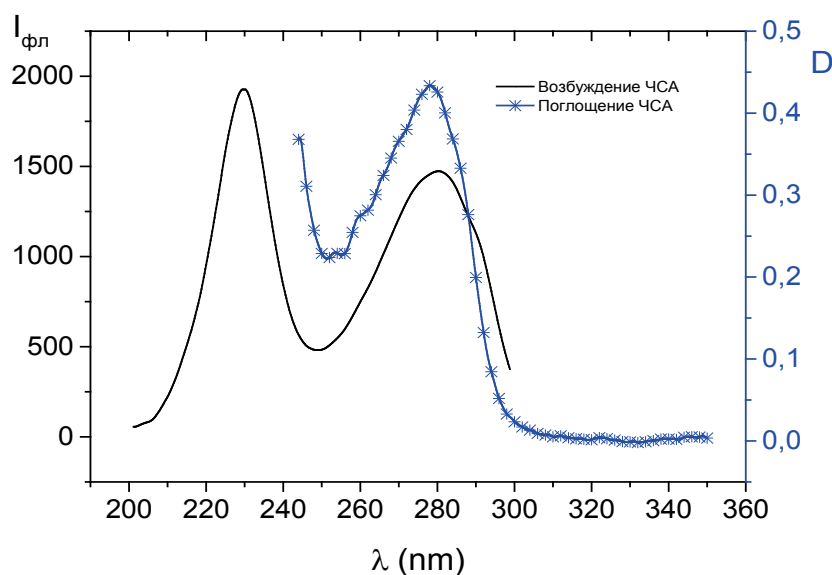
В работе были проведены исследования структурных параметров ЧСА в водных растворах с катехином при постоянном соотношении  $[\text{CCA}]:[\text{Cat}]=1:10$  и варьировании концентрации ионов кобальта в пределах  $[\text{Co}^{2+}]:[\text{CCA}]$  от 0 до 100.

На рисунке 1 показаны спектры УФ поглощения белка при различных концентрациях  $\text{CoCl}_2$  в растворе, измеренные через 1 час после приготовления. Измерение, проведенное через 1 сутки после приготовления, дало тот же результат. Из спектров растворов был вычтен спектр соответствующего растворителя (водного раствора  $\text{CoCl}_2$  той же концентрации). Видно, что спектр поглощения белка существенно не изменяется при соотношении  $[\text{CCA}]:[\text{Co}^{2+}]$  до 1:100.

Спектр флуоресценции ЧСА в водном растворе показан на рисунке 2. Возбуждение проводилось при  $\lambda = 278$  нм – в максимуме поглощения белка, при этом происходит возбуждение аминокислотных остатков Туг и Тгр, однако, в спектре флуоресценции белка присутствует только флуоресценция Тгр из-за переноса возбуждения с Туг на Тгр [12,13]. Максимум в спектре флуоресценции HSA наблюдается при  $\lambda = 342$  нм. Регистрируя флуоресценцию на этой длине волны, мы получили спектр возбуждения водного раствора ЧСА (рис. 3).



**Рисунок 2.** Спектр испускания ЧСА в водном растворе при возбуждении на 278 нм.

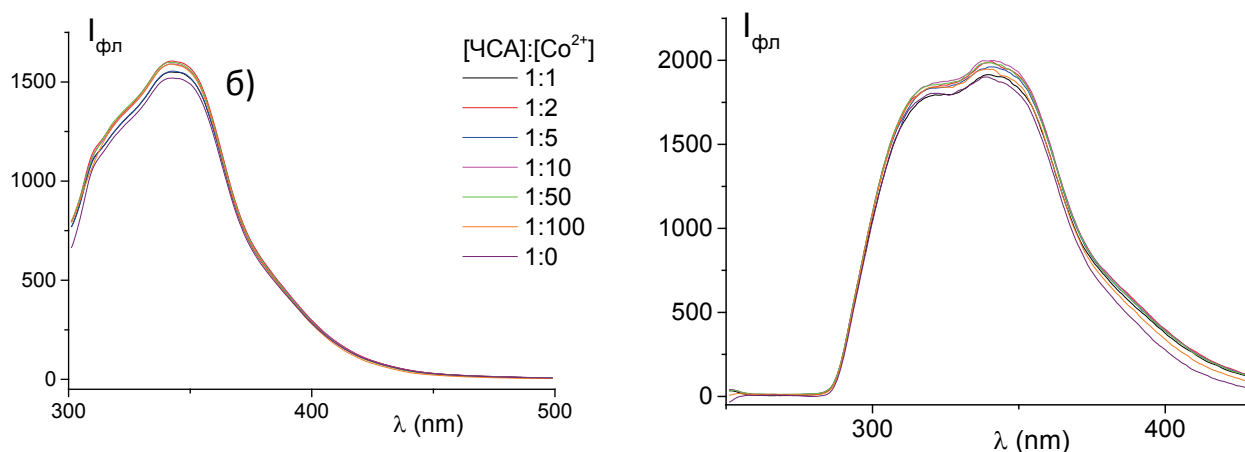


**Рисунок 3.** Спектр поглощения и возбуждения ЧСА в водном растворе

Сравнивая спектр возбуждения со спектром поглощения белка (рис. 3), а также со спектрами поглощения ароматических аминокислот [12], можно видеть, что длинноволновая полоса в спектре возбуждения соответствует  $\lambda_{\text{max}} = 278$  нм в спектре поглощения ЧСА. Однако, в спектре возбуждения имеется и коротковолновая полоса при  $\lambda = 230$  нм, возможно, она соответствует переходам в Туг и Тгр на более высокие электронные уровни, кроме того, в цистеине есть интенсивный переход при  $\lambda = 230$  нм.

Присутствие ионов  $\text{Co}^{2+}$  не оказывает существенного влияния на спектры флуоресценции белка при возбуждении на  $\lambda = 278$  нм (рис. 4а) и  $\lambda = 230$  нм (рис. 4б). Видно, что при большей энергии квантов возбуждения более чётко разрешается дополнительная коротковолновая полоса в спектре испускания. Можно было ожидать, что двухвалентный ион при сближении с флуорофором будет тушить флуоресценцию, однако, в изученных системах этого не наблюдается. Можно сделать вывод, что в окружение Тгр не попала ни вода, ни ионы  $\text{Co}^{2+}$ , следовательно, третичная структура белка осталась ненарушенной.

Результаты исследования ИК спектров ЧСА в присутствии  $\text{CoCl}_2$  приведены в таблице 1. На рисунке 5 показан пример разложения полосы Амид I на составляющие гауссовы контуры, отвечающие колебаниям пептидных групп, входящих в различные формы вторичной структуры белка. С ростом содержания ионов  $\text{Co}^{2+}$  наблюдаются изменения во вторичной структуре HSA: снижение количества  $\alpha$ -спиральных участков и рост  $\beta$ -слоёв. Поскольку в третичной структуре белка в этих системах значительных изменений не обнаружено, то можно предположить, что увеличение количества  $\beta$ -слоёв происходит за счет образования межмолекулярных  $\beta$ -структур, т.е. происходит агрегация белковых молекул. Отметим, что способ приготовления образцов для измерения ИК спектров (высушивание капли раствора белка на кристалле НПВО) мог способствовать дополнительной агрегации белка [9]. Этим также может объясняться низкое значение количества  $\alpha$ -спиралей и



**Рисунок 4.** Спектр испускания ЧСА в растворах  $\text{CoCl}_2$  при возбуждении (а) на 278 нм, (б) на 230 нм

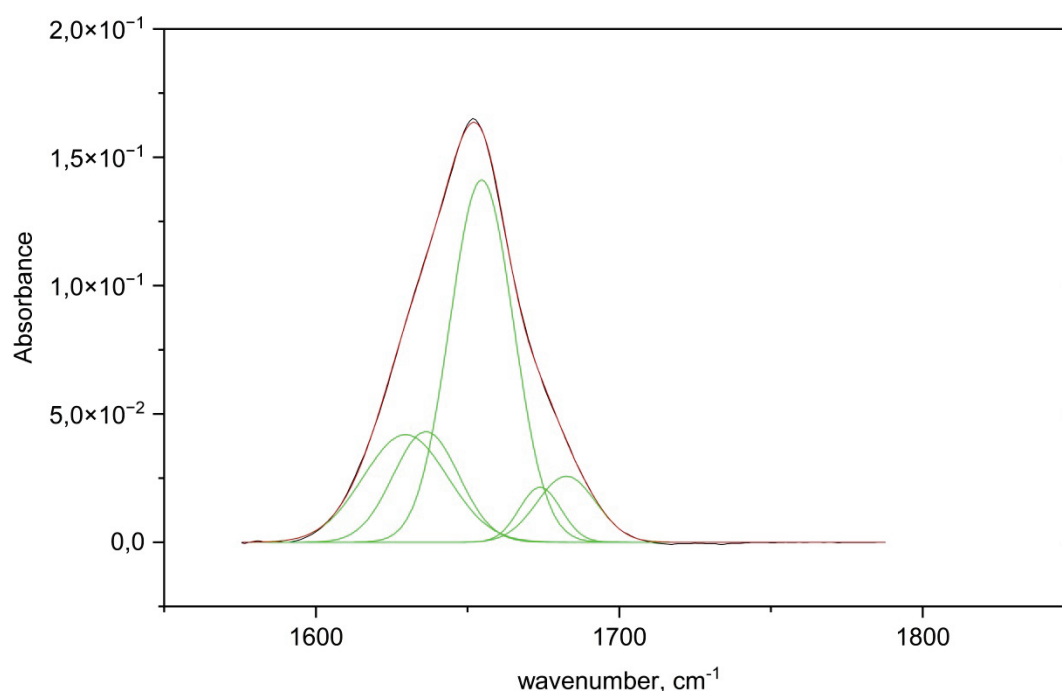
Таблица 1. Параметры вторичной структуры ЧСА в присутствии  $\text{Co}^{2+}$  по данным ИК спектроскопии

[ЧСА]:[ $\text{Co}^{2+}$ ]	$\alpha$ -спирали, $\pm 4\%$	$\beta$ - листы, $\pm 4\%$	$\beta$ - повороты, $\pm 4$
1:0	51	36	14
1:0,5	49	51	0
1:1	50	42	6
1:1,5	44	46	11
1:3	44	51	6
1:5	41	44	8
1:10	28	63	9

большое содержание  $\beta$ -слоёв в образце ЧСА без добавок (таблица 1). По данным рентгеноструктурного анализа, структура ЧСА содержит 67%  $\alpha$ -спиралей и не содержит  $\beta$ -слоёв [13], ранее методом ИК спектроскопии НПВО жидких растворов ЧСА были получены значения 55%  $\alpha$ -спиралей и 25%  $\beta$ -слоёв [14].

Рассмотрим результаты исследования структуры сывороточного альбумина в растворах, содержащих ионы кобальта и катехин. Спектр УФ поглощения катехина перекрывается со спектром ЧСА, что затрудняет интерпретацию спектров их комплексов. Мы будем рассматривать разностные спектры поглощения белка в многокомпонентных системах: из спектра раствора ЧСА с катехином и  $\text{CoCl}_2$  будем вычитать спектр раствора катехина с  $\text{CoCl}_2$  той же концентрации. Если взаимодействие отсутствует, то полученный разностный спектр будет совпадать со спектром ЧСА в водном растворе без добавок.

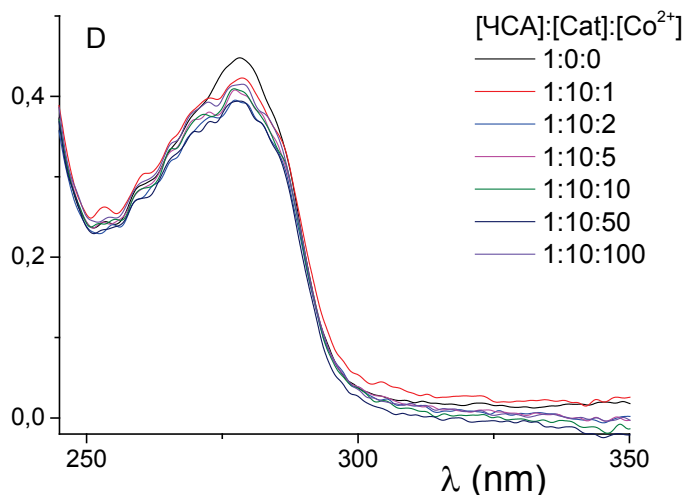
Разностные спектры УФ поглощения растворов ЧСА с катехином при постоянном соотношении  $[\text{ЧСА}]:[\text{Cat}]=1:10$  и варьировании концентрации ионов кобальта в пределах  $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}]$  от 0 до 100 показаны на рисунке 6. По сравнению со спектром ЧСА в отсутствии добавок, наблюдается снижение интенсивности поглощения в системах, содержащих катехин и кобальт, причем немонотонное с ростом концентрации катионов (рис. 7). Отличие разностных спектров от спектра HSA в водном растворе без добавок свидетельствует о взаимодействии компонентов, причем ионы  $\text{Co}^{2+}$  играют важную роль в этом взаимодействии. Наблюдаемые спектральные изменения могут свидетельствовать об изменении полярности окружения ароматических



Fitting Results

Peak Index	Peak Type	Area Intg	FWHM	Max Height	Center Grvty	Area IntgP
1	Gaussian	1,46692	32,86607	0,04193	1629,53668	19,96245
2	Gaussian	1,17053	25,53666	0,04306	1636,30427	15,92911
3	Gaussian	3,71319	24,72367	0,14109	1654,6332	50,53079
4	Gaussian	0,36944	16,19417	0,02143	1673,90938	5,02747
5	Gaussian	0,6283	22,94962	0,02572	1682,58748	8,55017

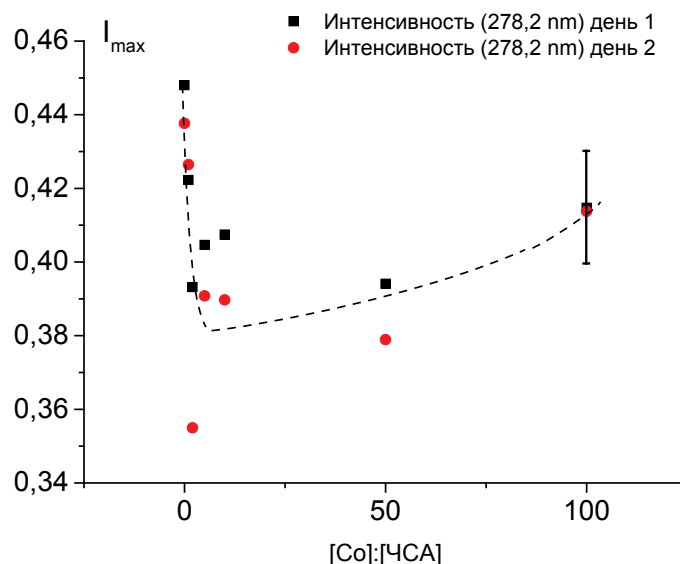
Рисунок 5. Разложение полосы Амид I ЧСА



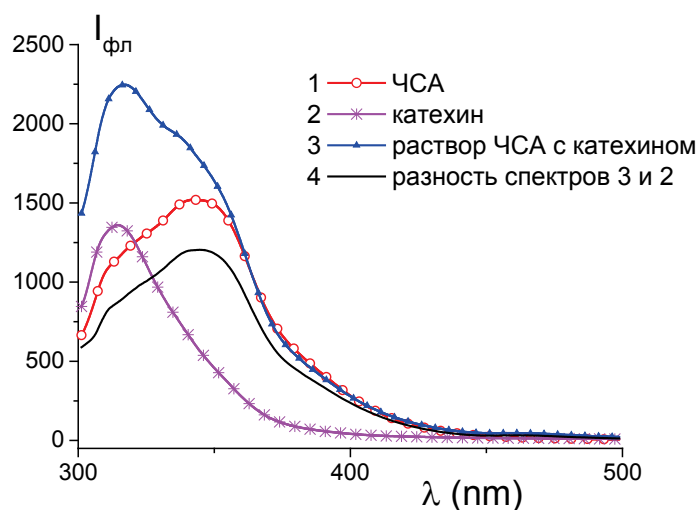
**Рисунок 6.** Разностные спектры УФ поглощения растворов ЧСА, содержащих катехин и  $\text{CoCl}_2$ , соотношения компонентов указаны на рисунке

аминокислот белка (то есть о нарушении глобулярной третичной структуры), либо о том, что молекула катехина взаимодействует с HSA в непосредственной близости от хромофоров.

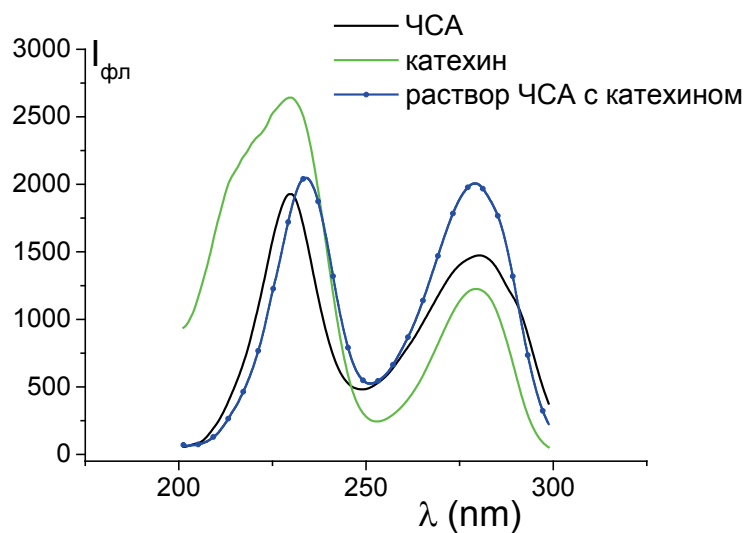
Спектры флуоресценции ЧСА, катехина и раствора, содержащего альбумин и катехин в тех же концентрациях при возбуждении в максимуме поглощения белка (278 нм), показаны на рисунке 8. Если сравнить результат вычитания из спектра флуоресценции комплекса спектра катехина со спектром испускания ЧСА, то заметно существенное снижение интенсивности флуоресценции белка в присутствии катехина. Это говорит о формировании комплекса альбумина с катехином. Причем, поскольку оба соединения флуоресцируют, и спектры их испускания перекрываются, то трудно сказать, какое соединение выступает тушителем. В спектрах возбуждения белка и катехина (рис. 9) присутствуют две полосы: 278 нм и коротковолновая в окрестности 230 нм. Видно, что при используемом соотношении концентраций при  $\lambda_{\text{возб}} = 278$  нм эффективнее возбуждается белок, а при возбуждении на более коротковолновой полосе эффективнее возбуждается катехин. Рассмотрим спектры испускания этих растворов при возбуждении на коротковолновой полосе (рис. 10).



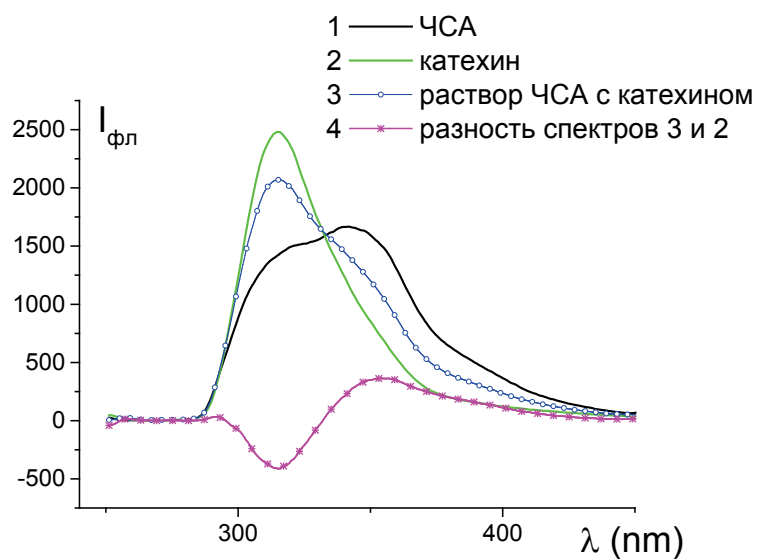
**Рисунок 7.** Зависимость интенсивности в максимуме разностного спектра УФ поглощения от молярного отношения  $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}]$



**Рисунок 8.** Спектры флуоресценции водных растворов ЧСА, катехина и раствора ЧСА с катехином, возбуждение на 278 нм

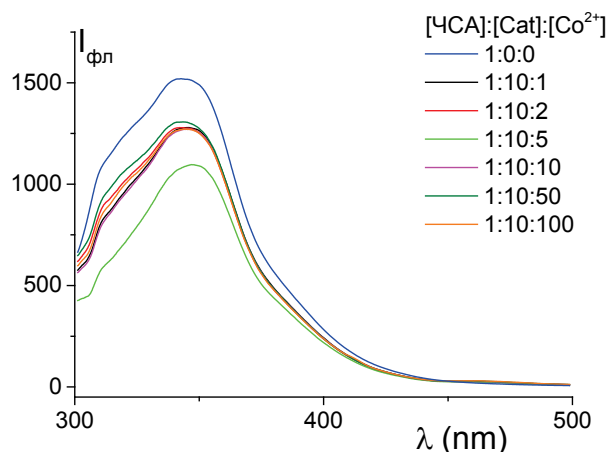


**Рисунок 9.** Спектры возбуждения водных растворов ЧСА, катехина и раствора ЧСА с катехином



**Рисунок 10.** Спектры флуоресценции ЧСА, катехина и раствора ЧСА с катехином при возбуждении на длинах волн в окрестности 230 нм

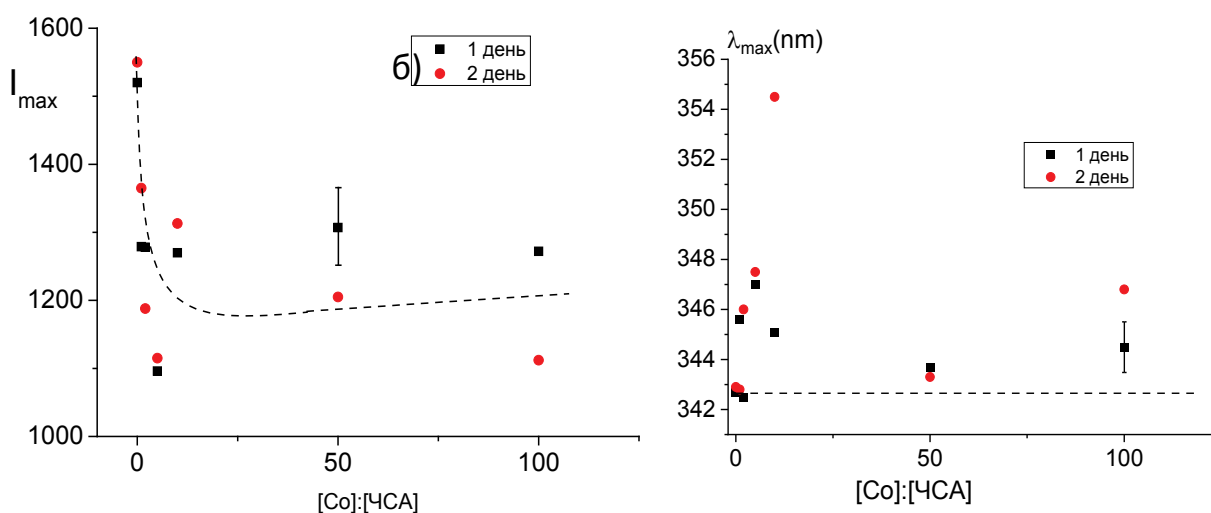




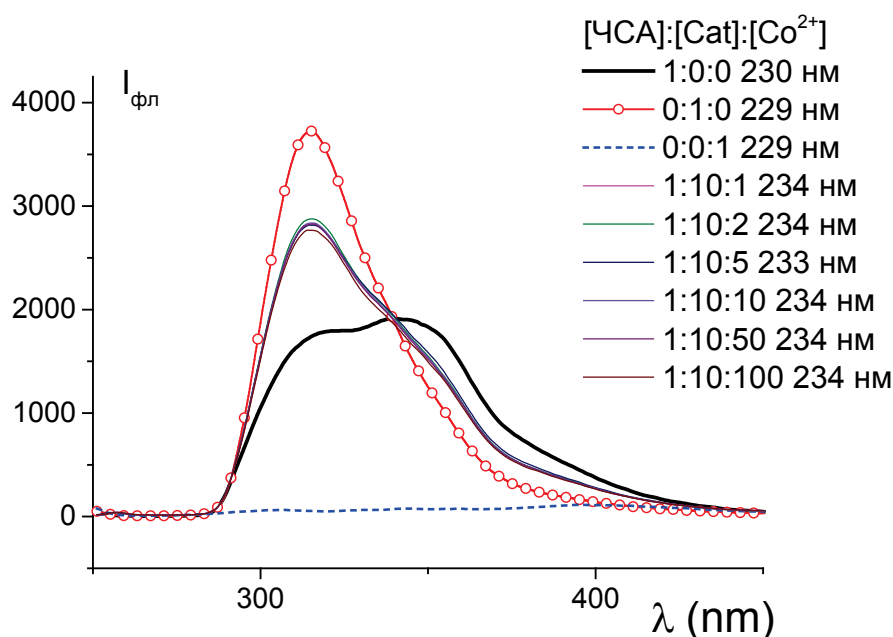
**Рисунок 11.** Разностные спектры флуоресценции растворов ЧСА, содержащих катехин и  $\text{CoCl}_2$ , соотношения компонентов указаны на рисунке

Видно, что интенсивность флуоресценции комплекса ниже интенсивности флуоресценции катехина (в максимуме полосы испускания катехина), и также ниже интенсивности флуоресценции белка (в максимуме полосы испускания белка). При попытке построить разностный спектр испускания ЧСА в комплексе получаем отрицательную интенсивность на полосе испускания катехина. Можно предположить, что в комплексе происходит взаимное тушение флуоресценции и белка, и катехина.

Спектры флуоресценции растворов ЧСА, содержащих катехин и ионы кобальта, при  $\lambda_{\text{возб}} = 278 \text{ нм}$ , приведены на рисунке 11. В этих системах интенсивность испускания альбумина снижается по сравнению с его флуоресценцией в водном растворе (рис. 12а), а также наблюдается смещение  $\lambda_{\text{max}}$  в длинноволновую область (рис. 12б). Оба эти фактора указывают на нарушение третичной структуры белка. На рисунке 13 показаны спектры испускания растворов ЧСА, содержащих катехин и ионы кобальта, при  $\lambda_{\text{возб}}$  в окрестности 230 нм (в максимуме коротковолновой полосы спектра возбуждения каждого раствора), на рисунке 14 показаны разностные спектры флуоресценции альбумина в этих системах. Здесь, аналогично ранее рассмотренным системам, содержащим ЧСА с катехином, наблюдается отрицательная полоса, показывающая значительное тушение флуоресценции в комплексе. Можно предположить, что мы наблюдаем суммарный эффект тушения флуоресценции катехина вследствие комплексообразования с белком, и флуоресценции белка. Причиной тушения флуоресценции белка может быть как нарушение третичной структуры, так и непосредственное взаимодействие с катехином и катионами кобальта. Отметим, что ионы  $\text{Co}^{2+}$  слабо влияют на флуоресценцию катехина.



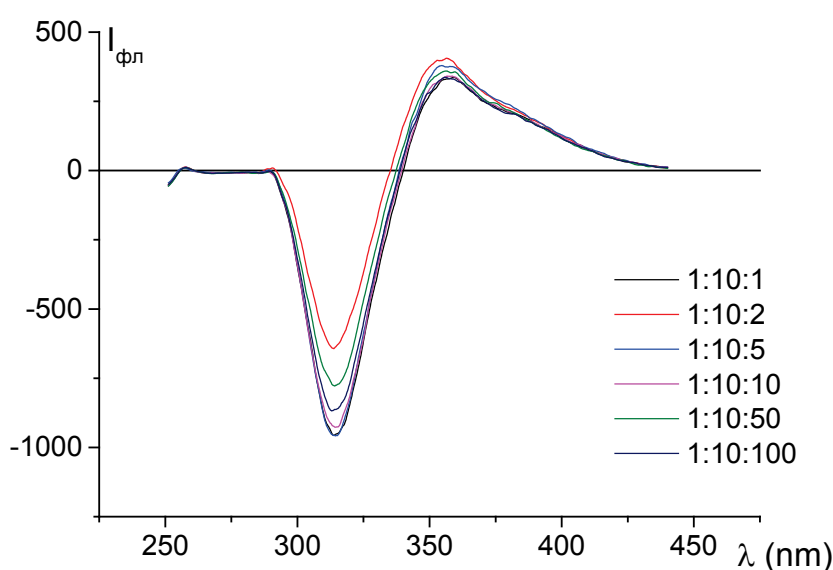
**Рисунок 12.** Зависимость интенсивности (а) и длины волны максимума (б) флуоресценции ЧСА в растворах с катехином и  $\text{CoCl}_2$  от молярного отношения  $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}]$



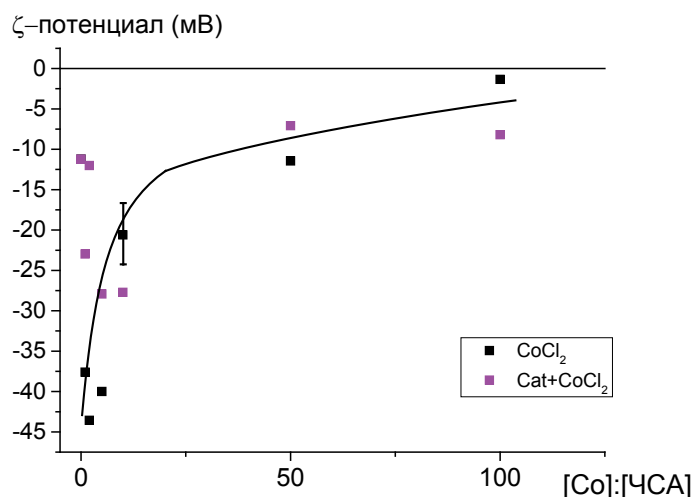
**Рисунок 13.** Спектры флуоресценции катехина (красная линия), ЧСА (черная) и их комплексов с добавлением разных концентраций кобальта. Длины волн возбуждения указаны в подписи на рисунке

Связывание белка с ионами  $\text{Co}^{2+}$  отчетливо проявляется при измерении дзета-потенциала частиц белка в растворах  $\text{CoCl}_2$  (рис. 15). Его значение резко растёт (уменьшается по модулю), приближаясь к 0 при  $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}] = 100$ . В трехкомпонентных растворах с катехином значения дзета-потенциала существенно не отличаются от значений в растворах альбумина с  $\text{CoCl}_2$ . Снижение поверхностного заряда белка способствует его агрегации.

По результатам, полученным в работе, можно сделать следующие выводы. В водных растворах человеческого сывороточного альбумина при соотношениях концентраций  $[\text{ЧСА}]:[\text{Co}^{2+}]$  до 1:100 не наблюдается нарушений в третичной структуре белка. Наблюдается снижение количества  $\alpha$ -спиралей и увеличение содержания  $\beta$ -слоев в структуре белка с ростом концентрации катионов кобальта. При взаимодействии ЧСА с катехином наблюдаются спектральные изменения, свидетельствующие об образовании комплекса. Предположительно, комплексообразование приводит к тушению флуоресценции обоих соединений. Причиной тушения флуоресценции белка может быть как нарушение его третичной структуры, так и непосредственное связывание катехина и катионов кобальта с ЧСА вблизи ароматических аминокислотных остатков. Плотность отрицательного заряда на молекулах ЧСА снижается с ростом концентрации  $\text{CoCl}_2$  в растворе, приближаясь к 0 при  $[\text{Co}^{2+}]:[\text{ЧСА}] = 100$ . Катехин не препятствует комплексообразованию ЧСА с  $\text{Co}^{2+}$ .



**Рисунок 14.** Разностные спектры флуоресценции ЧСА в растворах с разными концентрациями  $\text{CoCl}_2$  и постоянной концентрацией катехина



**Рисунок 15.** Дзета потенциал частиц белка в растворах, содержащих катехин и  $\text{CoCl}_2$

*Благодарности.* Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ "Оптические и лазерные методы исследования вещества".

#### Список литературы / References:

1. Iqbal M., Saeed A., Zafar S.I., Hazard J. FTIR spectrophotometry, kinetics and adsorption isotherms modeling, ion exchange, and EDX analysis for understanding the mechanism of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  removal by mango peel waste. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, vol. 164, iss. 1, pp. 161-171, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.07.141.
2. Mijun P., Shuyun S., Yuping Z. Influence of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  on (+)-catechin binding to bovine serum albumin studied by fluorescence spectroscopic methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012, vol. 85, iss. 1, pp. 190-197, doi: 10.1016/j.saa.2011.09.059.
3. Porter M.R., Kochi A., Karty J.A., Lim M.H., Zaleski J.M. Chelation-Induced Diradical Formation as an Approach to Modulation of the Amyloid- $\beta$  Aggregation Pathway. *Chem. Sci.*, 2015, vol. 6, pp. 1018-1026, doi: 10.1039/C4SC01979B.
4. Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M., Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell Biochem.*, 2010, vol. 345, pp. 91-104, doi: 10.1007/s11010-010-0563-x.
5. Grzesik M., Naparło K., Bartosz G., Sadowska-Bartosz I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*, 2018, vol. 241, pp. 480-492, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117.
6. Chaari A., Abdellatif B., Nabi F., Khan R.H. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit's polyphenols as potential inhibitors for human amylin fibril formation and toxicity in type 2 diabetes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 164, pp. 1794-1808, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.080.
7. Prasanna G., Jing P. Polyphenol binding disassembles glycation-modified bovine serum albumin amyloid fibrils. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, vol. 246, p. 119001, doi: 10.1016/j.saa.2020.119001.
8. Prasanna G., Jing P. Polyphenols redirects the self-assembly of serum albumin into hybrid nanostructures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 164, pp. 3932-3942, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.005.
9. Polyanychko A.M., Romanov N.R., Starkova T.Yu. Kostyleva E.I., Chikhirzhina E.V. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra. *Cell and Tissue Biology*, 2014, vol. 8, pp. 352-358, doi: 10.1134/S1990519X14040087.
10. Abrosimova K.V., Shulenina O.V., Paston S.V. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. *Journal of Physics: Conference Series*, 2016, vol. 769, p. 012016, doi: 10.1088/1742-6596/769/1/012016.
11. Kong J., Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, vol. 39, pp. 549-559, doi: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
12. Cantor C.R., Schimmel P.R. *Biophysical Chemistry. Part 2*. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980, 496 p.
13. Peters T.Jr. *All About Albumin, Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Elsevier Inc., 1995, 432 p.
14. Tankovskaia S.A., Abrosimova K.V., Paston S.V. Spectral demonstration of structural transitions in albumins. *Journal of Molecular Structure*, 2018, vol. 1171, pp. 243-252, doi: 10.1016/j.molstruc.2018.05.100.

## INTERACTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN WITH COBALT IONS AND CATECHIN

Fedotova E.V., Paston S.V.

St. Petersburg State University

*Peterhof, Ulyanovskaya str., 1–3, St. Petersburg, 198504, Russia; e-mail: st077318@student.spbu.ru*

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0617

**Abstract.** The structure of human serum albumin (HSA) in aqueous solutions in the presence of catechin at a constant molar ratio  $[HSA]:[Cat]=1:10$  and varying the concentration of cobalt ions within  $[Co^{2+}]:[HSA]$  from 0 to 100 is studied in this work. The study of the secondary structure of the protein is carried out by FTIR spectroscopy with deconvolution of the Amide I band. Changes in the tertiary structure of the protein are recorded by UV absorption and fluorescence spectra. It was found that at concentration ratios of  $[HSA]:[Co^{2+}]$  up to 1:100, there are no disturbances in the globular structure of the protein. There are a decrease in the number of  $\alpha$ -helices and a growth in the content of  $\beta$ -layers in the protein structure with an increase in the concentration of cobalt cations. When HSA interacts with catechin, spectral changes are observed, indicating the formation of a complex. Presumably, complex formation leads to quenching of the fluorescence of both compounds. The cause of protein fluorescence quenching can be either a violation of its tertiary structure or the direct binding of catechin and cobalt cations to HSA near aromatic amino acid residues. The value of the zeta potential of protein particles in solution, determined by the negative charge density on HSA, decreases with increasing concentration of  $CoCl_2$  in solution, approaching 0 at  $[Co^{2+}]:[HSA]=100$ . Catechin does not hinder from the complex formation of HSA with  $Co^{2+}$ .

**Key words:** *human serum albumin, metal ions, catechin, complexation, protein secondary structure, protein intrinsic fluorescence.*

## ПОИСК ПОТЕНЦИАЛОБРАЗУЮЩИХ ИОНОВ В ПИТАТЕЛЬНОМ РАСТВОРЕ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Кулешова Т.Э., Желначева П.В., Гасиева З.А., Галушко А.С., Панова Г.Г.

Агрофизический научно-исследовательский институт

Гражданский пр-кт, 14, г. Санкт-Петербург, 195220, РФ; e-mail: kuleshova@agrophys.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0618

**Аннотация.** В работе рассмотрено влияния состава питательного раствора на формирование разности потенциалов в корнеобитаемой среде и проведен поиск возможных потенциалообразующих ионов в биоэлектрохимических системах, основанных на электроактивных растительно-микробных взаимодействиях. Измерена разность потенциалов в корнеобитаемой среде при выращивании растений салата по технологии панопоники с использованием питательных растворов с увеличенным в два раза содержанием сульфата магния, хлорида калия и дигидроортофосфата калия. Проанализированы изменения электропроводности питательных растворов в процессе вегетационного периода и различия в водородных показателях и концентрациях ионов кальция, калия, аммония, нитрата в верхней и нижней приэлектродных областях биоэлектрохимических систем. Увеличение концентрации хлорида калия и дигидроортофосфата калия в питательном растворе привело к снижению и биомассы и среднего значения напряжения до 221 мВ и 188 мВ, соответственно, относительно характерной для контрольного варианта с классическим раствором Кнопа разности потенциалов составляющей 213 мВ. Удвоение концентрации сульфата магния, наоборот, вызвало повышение разности потенциалов до среднего значения 263 мВ и увеличения биомассы более чем на 30% относительно контроля. Вероятно, сульфат магния играет потенциалообразующую роль в формировании электрогенных реакций в системе корнеобитаемая среда-растения.

**Ключевые слова:** растительно-микробный топливный элемент, панопоника, углеродный войлок, салат.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отсутствие стабильности в обеспеченности ископаемым топливом (уголь, природный газ, нефть) и его неблагоприятном воздействии на окружающую среду привлекли всеобщее внимание к альтернативным возобновляемым источникам зеленой энергии. В частности, развитие получили устройства для получения электрической энергии за счет протекания химических реакций, сопутствующих жизнедеятельности живых организмов – биоэлектрохимические системы (БЭС). Устойчивое производство биоэлектричества в процессе метаболических реакций растений и микроорганизмов с помощью растительно-микробных топливных элементов (РМТЭ) поможет удовлетворить растущий спрос на экологически чистые энергетические ресурсы.

В корнеобитаемой среде растений наблюдается наличие электрических полей, при этом перемещение зарядов может быть обусловлено электроактивностью растений и микроорганизмов [1]. Микроорганизмы, способные напрямую передавать электроны на химическое вещество или материал, называются экзоэлектрогенами [2]. Электроактивные бактерии действуют как биокатализатор, который стимулирует разложение органических веществ с передачей электронов на анод, затем электроны транспортируются по внешней цепи к катоду [3], где ионы водорода, перемещающиеся в БЭС по градиенту концентраций, реагируют с кислородом с образованием воды [4]. Выделяемые корнями экссудаты выступают в роли углеродного субстрата для размножения благотворно влияющих на состояние корнеобитаемой среды популяций ризобактерий [5], стимулируют хемотаксис [6] и некоторые из них (например, муравьиная кислота, янтарная кислота и биотин) могут действовать как медиаторы межэлектронного переноса [7]. Наряду с этим ризосферные бактерии облегчают поглощение растениями питательных веществ, переводя их в более легко усвояемую форму [8]. Отмечено, что БЭС положительно влияет на развитие растений – в РМТЭ бобы мунг (*Vigna radiata*) росли почти в 2 раза быстрее, чем растения в контрольном варианте [9].

Теоретически рассчитанная удельная мощность РМТЭ, использующих в качестве энергоресурса способность бактерий окислять ризодепозиты, составляет 3,2 Вт/м<sup>2</sup> [10]. На данный момент одним из максимально достигнутых показателей в экспериментальных исследованиях является РМТЭ с использованием лилий (*Wachendorfia thyrsiflora* Burm.), позволивший получить 1,036 Вт/м<sup>3</sup> при функционировании в течении 54 дней [11].

Основное применение БЭС направлено на получение электричества в удаленных от основных энергосетей районах и совмещение с производством растительной продукции, что может быть реализовано как в естественных условиях, так и в искусственно создаваемых агроэкосистемах, фабриках защищенного грунта, зеленых крышах [12]. Также перспективным является использование РМТЭ для биоремедиации почв, создания биосенсоров, корректировки условий выращивания. БЭС активно внедряются в установки для очистки сточных вод [13] и удаления тяжелых металлов [14]. Кроме того, применение БЭС в производстве поможет снизить выбросы парниковых газов и улучшить состояние окружающей среды [15]

Одной из наиболее значимых причин низкой производительности БЭС является высокое сопротивление корнеобитаемой среды, выступающей аналогом электролита в электрохимических устройствах. К возможным путям решения данной проблемы относят: 1) подбор электродных систем с высокой удельной поверхностью (в качестве таких применяют углеродные материалы – графитовые войлок, ткань, гранулы, стержень, бумагу [16]); 2) изменение расстояния между электродами [17]; 3) внесение химического посредника – редокс-медиатора, повышающего эффективность транспорта электронов [18]; 4) уменьшение внутреннего сопротивления и увеличение проводимости [19]. Предположительно, в основе электрогенных процессов в корнеобитаемой среде могут лежать возникающие в результате транспорта ионов концентрационные эффекты. Ранее было показано, что использование в биоэлектрохимической системе питательного раствора, содержащего азот в нитратной форме ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ), позволило получать лучшие показатели по величине и стабильности генерируемого напряжения по сравнению с использованием растворов, включающих смешанную нитратно-аммонийную ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ) и амидную ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ) формы азота [20]. В связи с этим актуальным является идентификация ионов, обеспечивающих увеличение ионной проводимости и снижение сопротивления корнеобитаемой среды.

Целью данной работы было изучение влияния состава питательного раствора на формировании разности потенциалов в корнеобитаемой среде и поиск потенциалобразующих ионов.

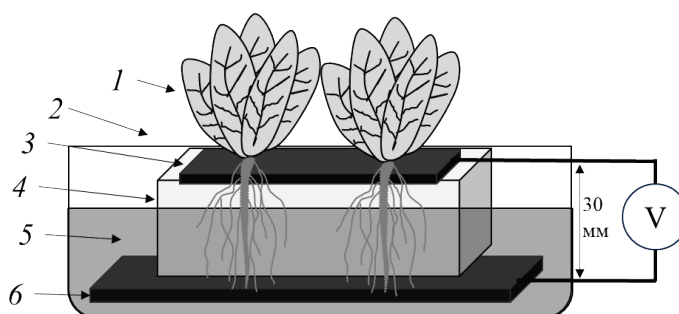
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения выращивали по технологии тонкослойной панопоники [21] в условиях интенсивной светокультуры на биополигоне ФГБНУ АФИ в вегетационной установке с лампами ДНаТ-400 в качестве источников света. Облученность составляла  $75 \pm 5$  Вт/м<sup>2</sup> в области фотосинтетически активной радиации (ФАР), световой период – 14 часов в сутки, температура воздуха  $+20$ - $22^\circ\text{C}$  днем и  $+18$ - $20^\circ\text{C}$  – ночью, относительная влажность воздуха – 65-70%. В качестве фитотест-объекта был выбран листовой салат (*Lactuca sativa* L.) сорта Тайфун производства ООО «Сортсемош» (Россия), имеющий развитую корневую систему стержневого типа с множеством боковых ответвлений.

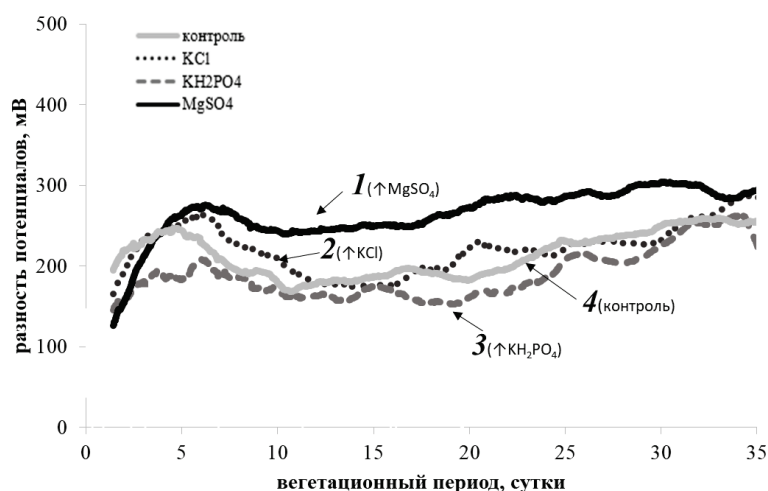
Для изучения электрических явлений, возникающих в корнеобитаемой среде, лучшим объектом являются искусственные среды на основе питательных растворов за счет меньшего количества влияющих внешних факторов (в первую очередь влажность) и большей управляемости параметрами (составом) среды обитания. Экспериментальная БЭС представляла собой ячейку площадью  $187 \times 137$  мм<sup>2</sup> и высотой 36 мм, в которой размещали и выращивали пророщенные семена салата в количестве 2 растений (рис. 1). Измеряемой характеристикой, отражающей биоэлектрическую активность корневой системы и сопутствующих микроорганизмов и протекание метаболических процессов в корнеобитаемой среде, служил биоэлектрический потенциал (БЭП) – разность потенциалов, измеряемая в нашем случае между корневой шейкой и дном емкости для выращивания. Для регистрации БЭП, формируемых в корнеобитаемой среде, в системы для культивирования устанавливали коррозионностойкие биосовместимые электроды из графитового войлока толщиной 5 мм с большой удельной поверхностью, обеспечивающие поверхностный электрический контакт с корневой системой [22]. Мониторинг изменения разности потенциалов осуществляли с помощью аппаратной платформы Arduino каждые 15 минут в течение всего вегетационного периода. Также в процессе эксперимента проводили измерение показателей электропроводности питательных растворов с помощью кондуктометра COM-80 (HM Digital, США).

В работе были исследованы следующие варианты питательного раствора Кнопа [23]:

- 1) БЭС1 – с увеличенным в два раза содержанием хлорида калия  $\text{KCl}$ , улучшающим развитие корневой системы за счет влияния на оводненность растений, повышения осмотического давления в клетках и их водоудерживающей способности;
- 2) БЭС2 – с увеличенным в два раза содержанием дигидроортофосфата калия  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , улучшающим продуктивность растений за счет реализации потребностей в фосфоре и калии;
- 3) БЭС3 – с увеличенным в два раза сульфата магния  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , приводящим к повышению урожайности за счет участия магния в фотосинтезе;
- 4) БЭС-К – контрольный вариант с классическим раствором Кнопа.



**Рисунок 1.** Схематичное изображение экспериментальной биоэлектрохимической системы, включающей: 1 – растительный объект, 2 – емкость для выращивания, 3 – верхний электрод, 4 – платформу для растений, покрытую влагопроводящим элементом, 5 – питательный раствор, 6 – нижний электрод, V – вольтметр



**Рисунок 2.** Разность потенциалов в корнеобитаемой среде при выращивании растений салата в БЭС с питательным раствором с увеличенным в два раза содержанием: 1 – сульфата магния (БЭС3), 2 – хлорида калия (БЭС1), 3 – дигидроортофосфата калия (БЭС2) и 4 – контрольный вариант с классическим раствором Кнопа (БЭС-К)

В каждый вариант были дополнительно добавлены микроэлементы по Чеснокову с соавторами [13].

Вегетационный опыт проводили дважды, с 3х-кратной повторностью исследуемых вариантов в каждом эксперименте. Уборку осуществляли на 35-ые сутки от посева семян. При уборке учитывали сырую массу надземной части и корней, высоту растений. Концентрацию ионов на электродах в конце эксперимента определяли готовя водную вытяжку и применяя соответствующие ионоселективные электроды, подключенные к анализатору Экотест-120 (Эконикс, Россия).

Статистическую обработку данных проводили с применением программ Excel 2010. Определяли средние значения изучаемых показателей, доверительные интервалы. Достоверность различий между вариантами оценивали методами параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики. Различия между вариантами считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

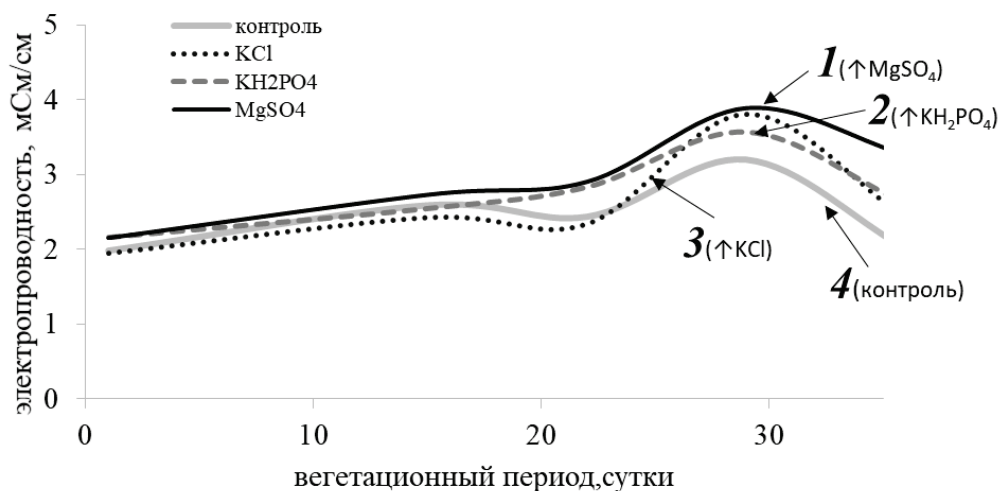
Динамика формирования разности потенциалов в корнеобитаемой среде в процессе развития растений салата представлена на рис. 2. Общая тенденция изменения БЭП в течение вегетационного периода при выращивании с использованием питательного раствора различного состава схожая – наблюдается рост напряжения в первые 5-ть дней, затем небольшой спад и на 10-ый день выравнивание, после чего с 15-ого дня значения снова возрастают и стабилизируются на уровне начальных и выше. Интересно отметить, что начиная с 5-ых суток эти изменения не превышают 15 % для варианта БЭС3, тогда как для контрольного варианта БЭС-К они составляют около 30 %, а для БЭС1 и БЭС2 достигают 40 %. Вероятно, добавление в питательный раствор сульфата магния способствовало более стабильной генерации БЭП в системе.

Сводные данные по полученным морфометрическим характеристикам салата и электрическим показателям БЭС представлены в таблице 1. Использование классического питательного раствора Кнопа приводило к формированию разности потенциалов в системе корнеобитаемая среда-растения на среднем уровне 213 мВ, с максимальным напряжением составляющим 260 мВ. Увеличение концентрации хлорида калия и дигидроортофосфата калия в питательном растворе снизило среднее значение напряжения до 221 мВ в БЭС1 и 188 мВ в БЭС2. Тогда как в удвоение концентрации сульфата магния, наоборот, вызвало повышение разности потенциалов до среднего значения 263 мВ и максимального 306 мВ в БЭС3, что превышало контрольные

**Таблица 1.** Морфометрические и электрические показатели исследованных БЭС

Вариант БЭС	Масса листьев, г	Высота растений, см	Масса корней, г	Среднее напряжение, мВ	Максимальное напряжение, мВ
БЭС1 (↑KCl)	15,7±2,1*	12,5±1,1	4,3±0,5*	221±19	289
БЭС2 (↑KН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> )	14,6±2,8*	13,4±2,2	6,4±0,8*	188±19*	264
БЭС3 (↑MgSO <sub>4</sub> )	35,3±2,7*	15,1±2,7	10,7±0,9*	263±22*	306*
БЭС-К	21,1±2,3	13,2±3,0	8,2±0,9	213±14	260

\* - значение достоверно отличается от контрольного на 5% уровне значимости



**Рисунок 3.** Электропроводность питательных растворов при выращивании растений салата в БЭС с увеличенным в два раза содержанием: 1 – сульфата магния (БЭС3), 2 – дигидроортофосфата калия (БЭС2), 3 – хлорида калия (БЭС1) и 4 – контрольный вариант с классическим раствором Кнопа (БЭС-К)

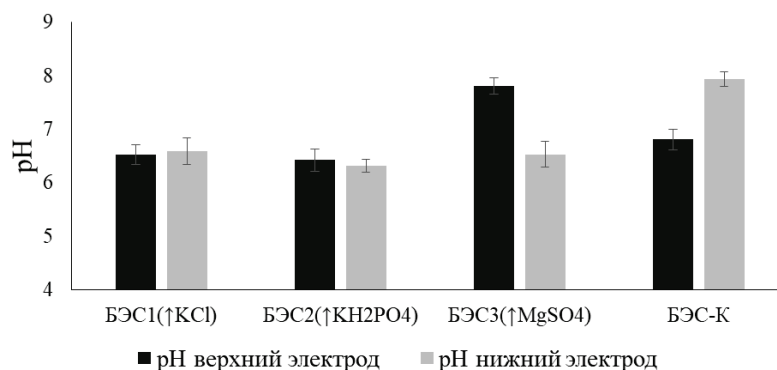
значения почти на 25%. Морфометрические показатели для вариантов БЭС1 и БЭС2 были также ниже контрольных, при этом в БЭС3 удалось достичь увеличения биомассы более чем на 30%.

На протяжении эксперимента проводилось измерение электропроводности питательных растворов в исследуемых БЭС (рис. 3). Изменение способности корнеобитаемой среды проводить ток коррелировало с динамикой формирования разности потенциалов – увеличение содержания ионов за счет концентрирования раствора в течение вегетационного периода приводило к росту напряжения в БЭС к концу опыта. Большие показатели электропроводности были характерны для корнеобитаемой среды БЭС3 с повышенной концентрацией сульфата магния.

Значения водородного показателя pH в верхней и нижней приэлектродных областях практически не отличались для БЭС1 и БЭС2, тогда как для БЭС3 и БЭС-К они различались более чем на 1 (рис. 4).

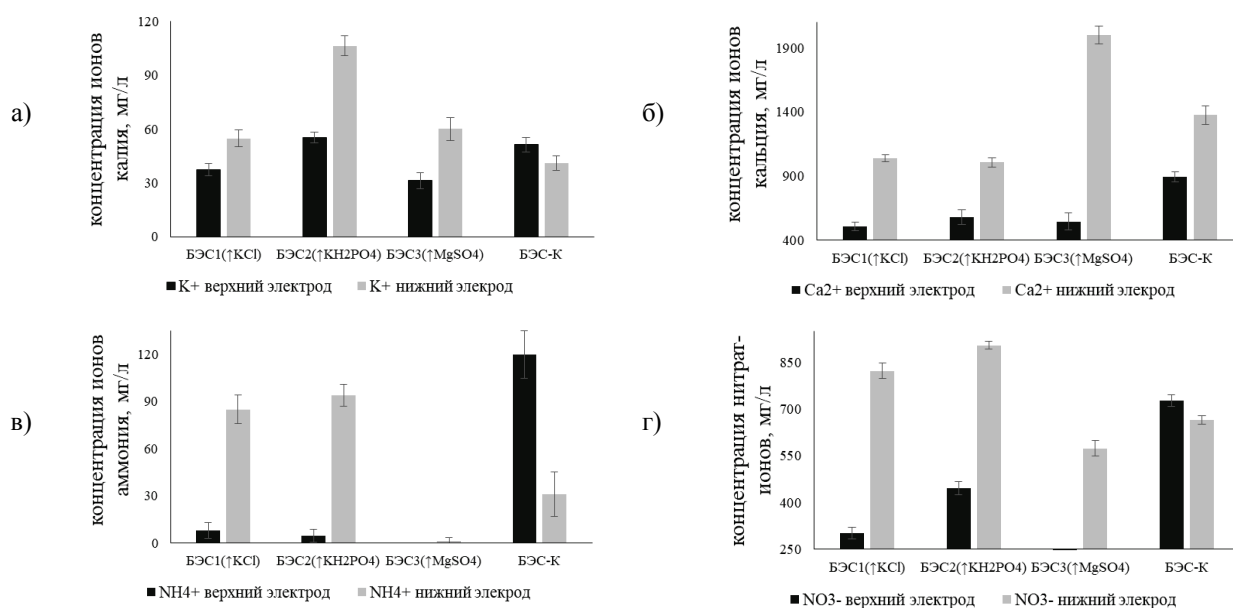
Для выявления потенциалобразующих ионов были измерены концентрации  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $Ca^{2+}$  в верхней и нижней приэлектродных областях (рис. 5). Во всех вариантах разработанных БЭС верхний электрод был электроотрицателен относительно нижнего электрода, что коррелирует с полученным содержанием ионов на них – на нижнем электроде больше положительных ионов  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ .

В таблице 2 представлены рассчитанные различия в показателях  $\Delta pH$  и концентрациях  $\Delta C$  ионов кальция, калия, аммония, нитрата в верхней и нижней приэлектродных областях БЭС. Видно, что наибольшие отличия в содержании ионов на электродах характерны для ионов кальция – около 500 мг/л для БЭС1, БЭС2 и БЭС-К и почти 1500 мг/л для БЭС3. Можно предположить, что из исследованных элементов ионы  $Ca^{2+}$  вносят решающий вклад в формирования разности потенциалов в корнеобитаемой среде. Для варианта БЭС3, где формировалось повышенное напряжение отмечается большее значение pH на верхнем электроде и большая концентрация ионов  $Ca^{2+}$  в области нижнего электрода.



**Рисунок 4.** Водородный показатель pH в приэлектродных областях верхней и нижней области БЭС с увеличенным в два раза содержанием: БЭС1 – хлорида калия, БЭС2 – дигидроортофосфата калия, БЭС3 – сульфата магния и БЭС-К – контрольный вариант с классическим раствором Кнопа





**Рисунок 5.** Содержание ионов а) калия, б) кальция, в) аммония, г) нитрата в приэлектродных областях верхней и нижней области БЭС с увеличенным в два раза содержанием: БЭС1 – хлорида калия, БЭС2 – дигидроортофосфата калия, БЭС3 – сульфата магния и БЭС-К – контрольный вариант с классическим раствором Кнопа

**Таблица 2.** Различия в показателях ΔрН и концентрациях ΔС ионов кальция, калия, аммония, нитрата в верхней и нижней приэлектродных областях БЭС с отличающимся составом питательного раствора

Вариант БЭС	ΔрН (рН <sub>верхний электрод</sub> – рН <sub>нижний электрод</sub> )	ΔС(K <sup>+</sup> ) (K <sup>+</sup> <sub>верхний электрод</sub> – K <sup>+</sup> <sub>нижний электрод</sub> )	ΔС(Ca <sup>2+</sup> ) (Ca <sup>2+</sup> <sub>верхний электрод</sub> – Ca <sup>2+</sup> <sub>нижний электрод</sub> )	ΔС(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sub>верхний электрод</sub> – NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sub>нижний электрод</sub> )	ΔС(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>верхний электрод</sub> – NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>нижний электрод</sub> )
БЭС1 (↑KCl)	-0,06	-17,4	-534	-77	-522
БЭС2 (↑KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,11	-51,2	-427	-89	-460
БЭС3 (↑MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O)	1,28	-28,9	-1456	-1	нет данных
БЭС-К	-1,13	10,3	-483	89	62

Магний является одним из важнейших соединений, участвующих в биосинтезе хлорофилла и повышающим интенсивность фотосинтеза. Увеличение его концентрации в питательном растворе привело не только к росту биомассы, но и улучшению электрических параметров БЭС.

Таким образом, можно сделать вывод, что наряду с нитратной формой азота, сульфат магния может играть потенциалобразующую роль в формировании электрогенных реакций в системе корнеобитаемая среда-растения – создании градиента концентраций ионов, в первую очередь водорода и кальция, что, вероятно, положительным образом отразилось на показателях роста растений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-4397.2022.5).*

#### Список литературы/References:

- Кулешова Т.Э., Галушко А.С., Панова Г.Г., Волкова Е.Н., Аполлон В., Шуан С., Севда С. Биоэлектрохимические системы на основе электроактивности растений и микроорганизмов в корнеобитаемой среде (обзор). *Сельскохозяйственная биология*, 2022, т. 57, № 3, doi: 10.15389/agrobiology.2022.3.425rus [Kuleshova T.E., Galushko A.S., Panova G.G., Volkova E.N., Apollon W., Shuang Ch., Sevda S. Bioelectrochemical systems based on the electroactivity of plants and microorganisms in the root environment (review). *Agricultural Biology*, 2022, vol. 57, no. 3 (In Russ.)].
- Juan A.D. Microbial Fuel Cell-Literature review. Technical evaluation of the microbial fuel cell technology in wastewater applications. *Res. Gate*, 2014, pp. 1-18, doi: 10.13140/2.4481.0569.
- Obileke K., Onyeaka H., Meyer E.L., Nwokolo N. Microbial fuel cells, a renewable energy technology for bio-electricity generation: A mini-review. *Electrochemistry Communications*, 2021, vol. 125, doi: 10.1016/j.elecom.2021.107003.

4. Pant D., Van Bogaert G., Diels L., Vanbroekhoven K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource technology*, 2010, vol. 101, no. 6, doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.017.
5. Chiranjeevi P., Yeruva D.K., Kumar A.K., Mohan S.V., Varjani S. Plant-microbial fuel cell technology. In *Microbial electrochemical technology*. Elsevier, 2019, doi: 10.1016/B978-0-444-64052-9.00022-4.
6. Dommergues Y.R., Krupa S.V. Interactions between Non-pathogenic Soil Microorganisms and Plants. *Developments in Agricultural and Managed-Forest Ecology (Book Series)*, Elsevier Science Ltd., Netherlands, 1978.
7. Schroder U. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2007, vol. 9, no. 21, pp. 2619-2629, doi: 10.1039/B703627M.
8. Mohan S.V., Mohanakrishna G., Chiranjeevi P. Sustainable power generation from floating macrophytes based ecological microenvironment through embedded fuel cells along with simultaneous wastewater treatment. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102, no. 14, doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.033.
9. Pamintuan K.R.S., Sanchez K.M. Power generation in a plant-microbial fuel cell assembly with graphite and stainless steel electrodes growing *Vigna Radiata*. *IOP conference series: materials science and engineering*, 2019, vol. 703, no. 1, doi: 10.1088/1757-899X/703/1/012037.
10. Strik D.P.B.T.B., Hamelers H.V.M., Snel J.F., Buisman C.J. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *International Journal of Energy Research*, 2008, vol. 32, no. 9, doi: 10.1002/er.1397.
11. Gulamhussein M., Randall D.G. Design and operation of plant microbial fuel cells using municipal sludge. *J. Water Process. Eng.*, 2020, vol. 38, p. 101653, doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101653.
12. Helder M., Strik D.P., Timmers R.A., Raes S.M., Hamelers H.V., Buisman C.J. Resilience of roof-top plant-microbial fuel cells during Dutch winter. *Biomass and Bioenergy*, 2013, vol. 51, no. 1-7, doi: 10.1016/j.biombioe.2012.10.011.
13. Lu L., Xing D., Ren Z.J. Microbial community structure accompanied with electricity production in a constructed wetland plant microbial fuel cell. *Bioresource technology*, 2015, vol. 195, doi: 10.1016/j.biortech.2015.05.098.
14. Habibul N., Hu Y., Wang Y.K., Chen W., Yu H.Q., Sheng G.P. Bioelectrochemical chromium (VI) removal in plant-microbial fuel cells. *Environmental science & technology*, 2016, vol. 50, no. 7, doi: 10.1021/acs.est.5b06376.
15. Arends J.B., Speeckaert J., Blondeel E., De Vrieze J., Boeckx P., Verstraete W., Rabaey K., Boon N. Greenhouse gas emissions from rice microcosms amended with a plant microbial fuel cell. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, vol. 98, doi: 10.1007/s00253-013-5328-5.
16. Maddalwar S., Nayak K.K., Kumar M., Singh L. Plant microbial fuel cell: opportunities, challenges, and prospects. *Bioresource Technology*, 2021, vol. 341, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125772.
17. Ahn Y., Logan B.E. Altering anode thickness to improve power production in microbial fuel cells with different electrode distances. *Energy and Fuels*, 2013, vol. 27, no. 1, doi: 10.1021/ef3015553.
18. Wilkinson S., Klar J., Applegarth S. Optimizing biofuel cell performance using a targeted mixed mediator combination. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 2006, vol. 18, no. 19-20, doi: 10.1002/elan.200603621.
19. Helder M., Strik D.P., Hamelers H.V., Buisman C.J. The flat-plate plant-microbial fuel cell: the effect of a new design on internal resistances. *Biotechnology for biofuels*, 2012, vol. 5, no. 1, doi: 10.1186/1754-6834-5-70.
20. Кулешова Т.Э., Желначева П.В., Гасиева З.А., Галушко А.С., Панова Г.Г. Зависимость биоэлектрического потенциала в корнеобитаемой среде от формы азота в питательном растворе. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 4, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0558 [Kuleshova T.E., Zhelnacheva P.V., Gasieva Z.A., Galushko A.S., Panova G.G. Dependence of the bioelectric potential in the root environment on the form of nitrogen in the nutrient solution. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 4 (In Russ.)].
21. Панова Г.Г., Удалова О.Р., Канаш Е.В., Галушко А.С., Кочетов А.А., Прияткин Н.С., Архипов М.В., Черноусов И.Н. Основы физического моделирования «идеальных» агроэкосистем. *Журнал технической физики*, 2020, vol. 90, no. 10, doi: 10.21883/JTF.2020.10.49792.429-19 [Panova G.G., Udalova O.R., Kanash E.V., Galushko A.S., Kochetov A.A., Priyatkin N.S., Arkhipov M.V. Chernousov I.N. Fundamentals of Physical Modeling of “Ideal” Agroecosystems. *Technical Physics*, 2020, vol. 65, no. 10 (In Russ.)].
22. Кулешова Т.Э., Бушлякова А.В., Галль Н.Р. Неинвазивное измерение биоэлектрических потенциалов растений. *Письма в Журнал технической физики*, 2019, vol. 45, no. 5, doi: 10.21883/PJTF.2019.05.47387.17541 [Kuleshova T.E., Bushlyakova A.V., Gall N.R. Noninvasive measurement of bioelectric potentials of plants. *Technical Physics Letters*, vol. 45, no. 3 (In Russ.)].
23. Чесноков В.А., Базырина Е.Н., Бушуева Т.М. *Выращивание растений без почвы*. Изд. ЛГУ, 1960 [Chesnokov V.A., Bazyrina E.N., Bushueva T.M. *Vyrashchivanie rastenij bez pochvy*. Izd. LGU, 1960 (In Russ.)].

**IDENTIFICATION OF POTENTIAL-GENERATING IONS IN THE NUTRIENT SOLUTION OF BIOELECTROCHEMICAL SYSTEM****Kuleshova T.E., Zhelnacheva P.V., Gasieva Z.A., Galushko A.S., Panova G.G.**

Agrophysical Research Institute

*Grazhdanskiy pr., 14, Saint-Petersburg, 195220, Russia; e-mail: kuleshova@agrophys.ru*

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0618

**Abstract.** The work considers the effect of the nutrient solution composition on the potential difference formation in the root environment. Identification of possible potential-generating ions in bioelectrochemical systems based on electactive plant and microbial interactions was carried out. The electropotential difference in the root environment was measured when growing lettuce with a nutrient solution with a double increased content of magnesium sulfate, potassium chloride and potassium dihydortophosphate. Changes in the electrical conductivity of nutrient solutions in the process of lettuce growing and the differences in the pH and concentrations of calcium, potassium, ammonium, nitrate ions in the upper and lower electrode areas of bioelectrochemical systems are analyzed. An increase in the concentration of potassium chloride and potassium dihydortophosphate in a nutrient solution led to a decrease in both biomass and the average voltage value to 221 mV and 188 mV, respectively, relatively characteristic of the control option with a classic solution of the potential difference 213 mV. The doubling of the magnesium sulfate concentration, on the contrary, caused an increase in the potential difference to an average value of 263 mV and an increase in biomass by more than 30% relative to control. Probably, magnesium sulfate plays a potential role in the formation of electogenic reactions in the root environment.

**Key words:** *plant-microdal fuel cell, panoponica, carbon felt, lettuce.*

## КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА (III) С КАТЕХИНОМ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК

Касьяненко Н.А., Ролич В.И., Никитин Д.А.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7-9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: st075754@student.spbu.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0619

**Аннотация.** Современные препараты для лечения онкозаболеваний обладают повышенной токсичностью для организма. Также известны случаи, когда клетки опухолей проявляют резистентность к определённым классам препаратов. Поэтому поиск и исследование новых соединений, обладающих противоопухолевыми свойствами, остаётся актуальной задачей. В последние годы возник интерес к антиоксидантной и противоопухолевой активности катехинов, которые относятся к растительным флавоноидам, а потому их применение в терапии, а также их совместное использование с более токсичными соединениями может снизить негативное воздействие лечения на организм в целом. Обычно противоопухолевая активность определяется возможностью связывания соединений с ДНК. В работе проводится изучение взаимодействия ДНК с катехином в растворе, а также рассматривается влияние на ДНК одновременного введения в раствор катехина и ионов железа. Показано, что молекулы катехина с ДНК не взаимодействуют, тогда как присутствие ионов железа способствует формированию комплексов ДНК-катехин-железо, в которых, как ожидается, катехин сможет проявить свою биологическую активность. При достаточно больших концентрациях хлорида железа в растворах катехина образуются дискретные наночастицы. Использовали методы УФ-спектрофотометрии, низкоградиентной вискозиметрии, динамического рассеяния света и атомной силовой микроскопии.

**Ключевые слова:** (+)-катехин, ДНК, ионы железа (III), комплексы ДНК-катехин-ионы железа.

В настоящее время одним из наиболее широко используемых методов в терапии различного рода патологий является комбинированное использование различных препаратов и биологических добавок для снижения негативных последствий для организма от приёма активного вещества. При этом важную роль продолжает играть и синтез новых веществ, но он требует намного больших ресурсов и временных затрат. Крайне важным является выявление механизмов совместного действия различных агентов *in vivo*. Для этого используют модельные системы (*in vitro*) – растворы, содержащие основной объект терапии (для онкологических заболеваний это обычно молекула ДНК) и компоненты терапевтического композита, исследование которых позволяет получить информацию о молекулярных основах действия различных веществ.

Большой интерес вызывает использование флавоноидов, который имеют растительное происхождение. Они содержатся в чае, кофе, некоторых ягодах и фруктах. Это гарантируют низкую токсичность и частичное или полное отсутствие побочных эффектов при их использовании в медицине. В частности, катехины показывают антиоксидантные свойства и обладают высокой биологической активностью, что определяет их использование при лечении заболеваний бактериального и вирусного происхождения [1]. Существуют данные, что катехины защищают ДНК от поражающего действия активных форм кислорода, что снижает риск развития онкологических заболеваний. Кроме того, катехины способны влиять на активность гена p53, что стимулирует гибель клеток опухолей [2]. Усиление биологической активности катехинов, в связи с этим стало одной из актуальных задач в последнее время. Так, например существуют данные, что совместное действие катехинов с ионами трёхвалентного железа усиливает терапевтические свойства катехинов [3]. В работе была проверена возможность формирования трёхкомпонентного комплекса ДНК-ионы железа (III)-катехин.

Для приготовления исследуемых систем использовали соль хлорида железа (III), (+)-катехин и натриевую соль высокомолекулярной тимусной ДНК (препараты фирмы Sigma Aldrich). Все растворы содержали 0,005 М NaCl для стандартизации ионных условий (изменяющаяся концентрация собственных противоионов ДНК в этих условиях не вносит заметного вклада в ионную силу раствора). Использовали спектрофотометр СФ-56 (Россия), низкоградиентный ротационный вискозиметр оригинальной конструкции, принципиальная схема которого приведена в работе [4], установку для изучения динамического рассеяния света PhotoCor с программным обеспечением DynaLS, атомный силовой микроскоп Nanoscope IV Bruker.

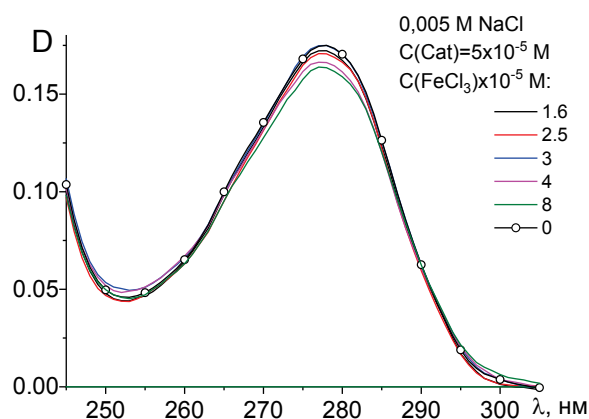
На первом этапе исследования были изучены попарные взаимодействия компонентов. Различными методами было показано, что свободные катехины с молекулой ДНК в растворе не взаимодействуют. Ни вязкость растворов ДНК, ни спектр поглощения макромолекулы не меняются. При изучении взаимодействия ионов трёхвалентного железа с катехином методов УФ спектрофотометрии было показано, что спектр поглощения катехина в 0,005 М NaCl немного изменяется с ростом концентрации FeCl<sub>3</sub> (концентрация катехина в этом опыте оставалась постоянной), что указывает на формирование комплексов.

Согласно данным работы [5], взаимодействие катехинов с ионами железа в водном растворе приводит к образованию наночастиц. При этом необходимо использовать существенно большие концентрации компонентов, чем были приготовлены при изучении спектральных свойств катехина в растворах, содержащих соль железа. Для проверки возможности формирования наночастиц катехин-железо в наших экспериментах использовали метод динамического светорассеяния, который позволяет получить информацию о размерах частиц и в молекулярных,

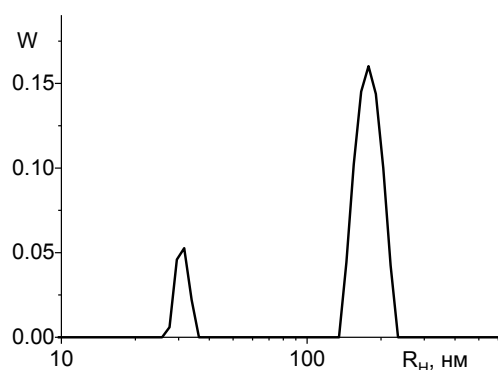
и в коллоидных растворах. Иными словами, фазовое разделение в растворе при формировании наночастиц не мешает корректной оценке распределения частиц по размерам.

Были приготовлены растворы 0,005 М NaCl, содержащие  $5 \times 10^{-5}$  М катехина и различные концентрации  $\text{FeCl}_3$  в диапазоне от  $3 \times 10^{-3}$  до  $6 \times 10^{-2}$  М. На рисунке 2 для примера приведено распределение частиц по размерам в растворе, содержащем 0,005 М NaCl,  $5 \times 10^{-5}$  М катехина и  $3 \times 10^{-2}$  М  $\text{FeCl}_3$ , полученное при угле рассеяния  $60^\circ$ . Бимодальное распределение сохранялось в широком диапазоне концентраций  $\text{FeCl}_3$  для всех углов рассеяния. Две моды в распределениях с учетом усреднения по всем углам и по всем используемым концентрациям соли железа соответствуют частицам с гидродинамическим радиусом  $(35 \pm 10)$  нм и  $(180 \pm 50)$  нм.

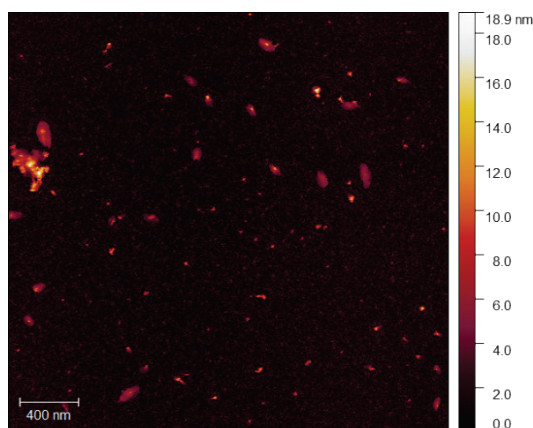
Те же растворы использовали для анализа изображений, полученных методом атомной силовой микроскопии. Для приготовления образцов каплю соответствующего раствора наносили на поверхность свежесколотой слюды и высушивали. Затем методом прямого сканирования на воздухе были получены изображения, одно из которых приведено на рисунке 3.



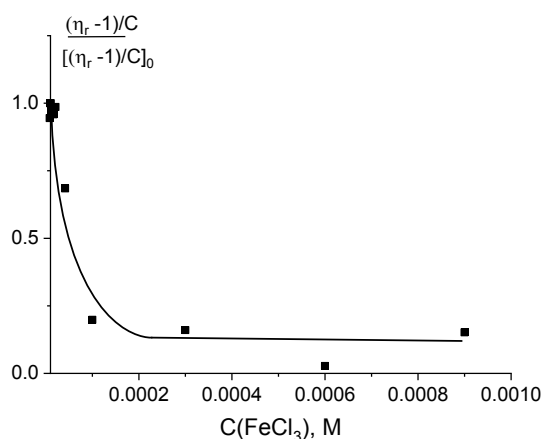
**Рисунок 1.** Спектры поглощения катехина в растворах, содержащих 0,005 М NaCl и разные концентрации  $\text{FeCl}_3$  (концентрации указаны на рисунке). Спектры скорректированы с учетом вклада соли железа в оптическую плотность растворов



**Рисунок 2.** Пример распределения частиц по размерам в растворах, содержащих 0,005 М NaCl,  $5 \times 10^{-5}$  М катехина и  $3 \times 10^{-2}$  М  $\text{FeCl}_3$ . Угол рассеяния –  $60^\circ$



**Рисунок 3.** Изображение, полученные при помощи АСМ для раствора  $\text{FeCl}_3$  с катехином в 0,005 М NaCl



**Рисунок 4.** Зависимость относительного изменения приведённой вязкости растворов ДНК от концентрации  $\text{FeCl}_3$  в растворе.  $C(\text{ДНК})=0,0066\%$

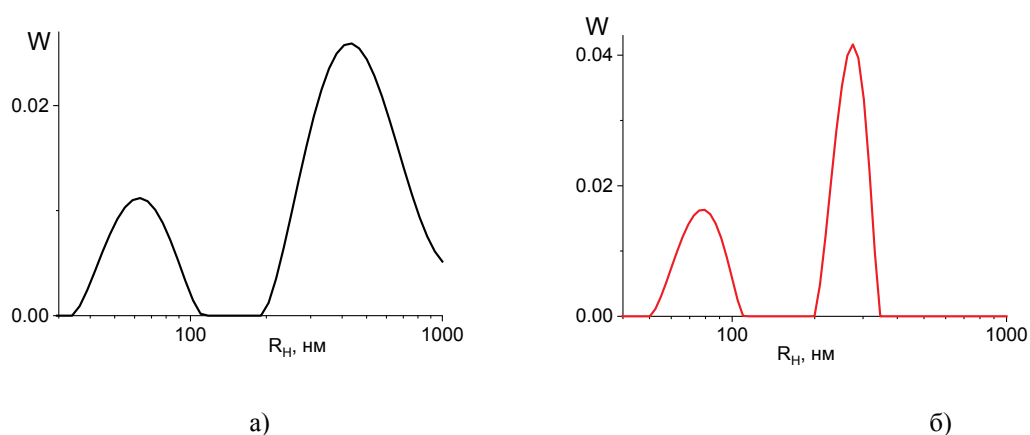
Анализ рисунка 3 показывает, что на подложке присутствуют малые плотные частицы размером порядка 40–60 нм и более рыхлые частицы размером чуть ниже 200 нм, что в целом согласуется с данными, полученными методом динамического рассеяния света.

Анализируя на основании полученных данных взаимодействие катехина с ионами железа в растворе, можно заключить, что формирование комплексов идет во всех используемых растворах. При больших концентрациях соли железа в растворах формируются дискретные наночастицы. Ранее было показано, что ионы различных металлов увеличивают антиоксидантную активность катехинов, которая оставалась высокой и постоянной при pH 6–12, но снижалась в кислых и сильнощелочных растворах [6]. Это указывает на формирование комплексов катехинов с ионами металлов.

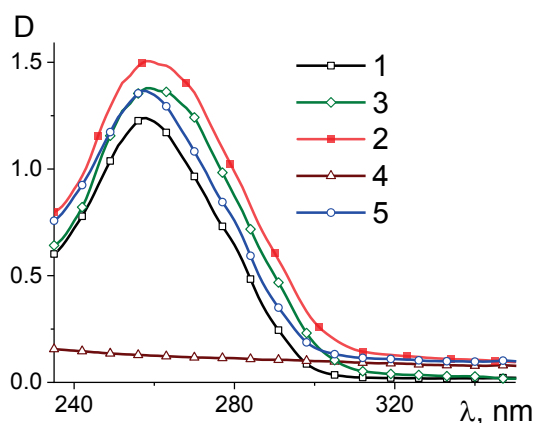
Рассмотрим результат взаимодействия молекулы ДНК с ионами железа в растворе. Такое взаимодействие подробно изучалось ранее [7]. Для используемых растворов методом вискозиметрии было показано, что взаимодействие ДНК с ионами железа в растворе 0,005 М NaCl приводит к уменьшению объема её молекулярного клубка, а при достаточно больших концентрациях ионов железа – к компактизации макромолекулы и выпадению ДНК в осадок. Это следует из зависимости приведённой вязкости растворов ДНК от концентрации хлорида железа (III) в растворе. Объем молекулярного клубка ДНК достигает своего минимального значения при концентрации ионов  $[\text{Fe}^{3+}] = 10^{-4}$  М. В наших экспериментах при рассмотрении взаимодействия катехина с ДНК в присутствии ионов железа мы использовали концентрацию  $[\text{Fe}^{3+}] = 5 \times 10^{-5}$  М, когда компактизация макромолекулы уже наблюдается, но раствор остается молекулярным и появления и не происходит конденсации ДНК.

О компактизации молекулы ДНК в присутствии ионов железа говорят и данные динамического светорассеяния (рис. 5).

Полученные для растворов ДНК функции распределения частиц по размерам бимодальны. На основе расчёта радиуса инерции невозмущенной молекулы ДНК известной молекулярной массы (в эксперименте  $M = 12 \times 10^6$  г/моль была определена вискозиметрически) было принято решение медленную моду считать ответственной за поступательное движение молекулярного клубка и использовать ее для оценки



**Рисунок 5.** Распределение частиц по размерам в растворах свободной ДНК (а) и ДНК в комплексах с ионами железа (б),  $C(\text{DNA}) = 0,006\%$ ,  $C(\text{FeCl}_3) = 50 \mu\text{M}$ . Угол рассеяния  $60^\circ$



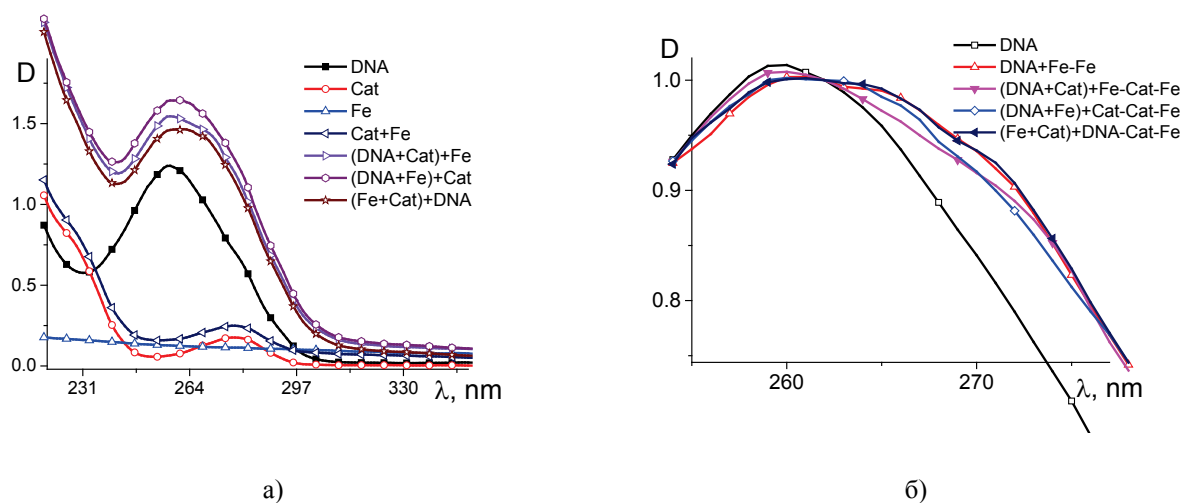
**Рисунок 6.** Спектры поглощения ДНК (1), комплекса ДНК с ионами железа (2), вычисленный спектр поглощения ДНК в комплексе с учетом оптической плотности раствора хлорида железа (3), оптическая плотность раствора хлорида железа используемой концентрации (4), сумма спектров поглощения ДНК и раствора хлорида железа (5)

гидродинамического радиуса макромолекулы. Таким образом, данные динамического рассеяния света показывают, что гидродинамический радиус клубка ДНК уменьшается с  $(430 \pm 90)$  нм до  $(280 \pm 50)$  нм, что согласуется с данными вискозиметрии.

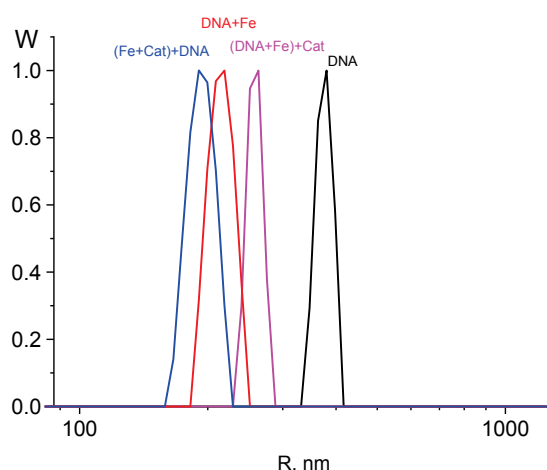
Связывание ионов железа с молекулой ДНК фиксируется и по изменению спектра поглощения ДНК (рис. 6).

Перейдём к рассмотрению взаимодействия ДНК с катехином и ионами железа при их совместном добавлении в раствор ДНК. Были приготовлены растворы с одной и той же концентрацией ДНК (0,006%), катехина (50  $\mu$ M) и хлорида железа (50  $\mu$ M). Спектры поглощения полученных растворов при разном порядке смешивания компонентов, а также вычисленные спектры поглощения ДНК в этих растворах, представлены на рисунке 7. На рисунке введены обозначения: спектры поглощения растворов, содержащих только ДНК, только катехин и только соль железа в 0,005 M NaCl обозначены как DNA, Cat и Fe соответственно; спектр поглощения смеси катехина и соли железа обозначен как Cat+Fe, спектры поглощения тройных комплексов обозначены (DNA+Cat)+Fe, (DNA+Fe)+Cat при введении в раствор ДНК сначала катехина, а потом Fe<sup>3+</sup> и наоборот. Предварительное смешивание растворов катехина и FeCl<sub>3</sub> с последующим соединением смеси с раствором ДНК обозначено как (Fe+Cat)+DNA.

Спектры поглощения ДНК в трёхкомпонентных системах отличаются как от спектра поглощения свободной ДНК, так и от спектра поглощения ДНК в комплексах с ионами железа (при добавлении катехина в раствор ДНК ее спектр не меняется, так как взаимодействие компонентов отсутствует). При добавлении ДНК к раствору, содержащему комплексы катехина с ионами железа, спектр поглощения ДНК совпадает со спектром поглощения ДНК в комплексах с железом, что говорит о связывании ДНК с ионами железа в представленной системе. Если сравнить результат разного порядка смешивания, то можно однозначно сказать, что присутствие катехина влияет на спектральные свойства систем. Иными словами, формируются комплексы ДНК-Fe-Cat.



**Рисунок 7.** Спектры поглощения растворов в 0,005 M NaCl (а) и вычисленные нормированные спектры поглощения ДНК в этих растворах (б). Пояснения в тексте



**Рисунок 8.** Распределение частиц по размерам в трёхкомпонентных растворах, полученное методом динамического светорассеяния. Угол рассеяния  $60^\circ$

**Таблица 1.** Значение приведенной вязкости растворов ДНК, содержащих катехин и ионы железа при разном порядке их добавления. Обозначения – как на рисунках 7 и 8

Раствор	$\eta_{пр}$ , дл/г
DNA	$110 \pm 8$
DNA+Cat	$115 \pm 9$
DNA+Fe	$50 \pm 4$
(DNA+Cat)+Fe	$40 \pm 7$
(DNA+Fe)+Cat	$35 \pm 3$
DNA+(Fe+Cat)	$27 \pm 2$

Методом динамического рассеяния света были исследованы аналогичные системы с концентрацией катехина  $25 \mu\text{M}$  (рис. 8). Хорошо видно, что положение главного пика распределения отражает изменение размера молекулярного клубка ДНК в комплексах. Этот результат демонстрирует, что формирование комплексов ДНК с катехином и ионами железа зависит от порядка добавления компонентов в раствор ДНК.

При этом во всех растворах присутствие ионов железа обеспечивает компактизацию ДНК. Данные низкоградиентной вискозиметрии согласуются с результатами, полученными при исследовании систем методом динамического светорассеяния. В таблице 1 указаны приведенные вязкости растворов трёхкомпонентных систем при разном порядке добавления компонентов в раствор ДНК.

Действительно, а основании изменения приведенной вязкости растворов ДНК можно заключить, что объём клубка ДНК в трёхкомпонентных системах уменьшается по сравнению с таковым для свободной ДНК.

На основе полученных результатов можно заключить, что при взаимодействии ионов трёхвалентного железа с катехинами в водном растворе при достаточно больших концентрациях соли железа образуются дискретные наночастицы. В растворах ДНК при добавлении катехина и ионов железа в концентрациях менее  $10^{-4}$  М формируются комплексы ДНК-ионы железа-катехин. На формирование комплексов слабо влияет порядок добавления катехина и ионов железа в раствор ДНК. Взаимодействие ДНК с молекулами катехина в растворе происходит исключительно в присутствии ионов трёхвалентного железа.

#### Список литературы / References:

- Vinson J.A., Su X., Zubik L., Bose P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, pp. 5315-5321, doi: 10.1021/jf0009293.
- Cadona F.C., Dantas R.F., de Mello G.H., Silva-Jr F.P. Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, pp. 1-20, doi: 10.1080/10408398.2021.1913091.
- Manna M.S., Saha P., Ghoshal A.K. Iron complexation of pharmaceutical catechins through selective separation. *RSC Adv.*, 2014, vol. 4, 26247-26250, doi: 10.1039/c4ra03683b.
- Frisman E.V., Schagina L.V., Vorobiev V.I. A glass rotation viscometer. *Biorheology*, 1965, vol. 2, pp. 189-194.
- Wang Z., Fang C., Mallavarapu M. Characterization of iron-polyphenol complex nanoparticles synthesized by Sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Environmental Technology & Innovation*, 2015, vol. 4, pp. 92-97, doi: 10.1016/j.eti.2015.05.004.



6. Kumamoto M., Sonda T., Nagayama K., Tabata M. Effects of pH and metal ions on antioxidative activities of catechins. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2001, vol. 65, pp. 126-132, doi: 10.1271/bbb.65.126.
7. Kasyanenko N., Arikainen N., Frisman E. Investigation of DNA complexes with iron ions in solution. *Biophysical Chemistry*, 1998, vol.70, pp. 93-100, doi: 10.1016/s0301-4622(97)00111-7.

### COMPLEXES OF IRON (III) WITH CATECHIN AND THEIR INTERACTION WITH DNA

Nikitin D.A., Kasyanenko N.A., Rolich V.I.

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7-9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: st075754@student.spbu.ru

Received 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0619

**Abstract.** Modern anticancer drugs have increased toxicity to the human body. There are also cases when tumor cells show resistance to certain classes of drugs. Therefore, the search and study of new compounds with antitumor properties remains an urgent task. In recent years, interest has arisen in the antioxidant and antitumor activity of catechins, which belong to plant flavonoids, and therefore their use in therapy, as well as their combined use with more toxic compounds, can reduce the negative impact of treatment on the body as a whole. Typically, antitumor activity is determined by the ability of compounds to bind to DNA. The paper studies the interaction of DNA with catechin in solution, and also considers the effect DNA of the simultaneous introduction of catechin and iron ions into the solution on DNA conformation. It has been shown that catechin molecules do not interact with DNA, while the presence of iron ions promotes the formation of DNA-catechin-iron complexes, in which catechin is expected to be able to exhibit its biological activity. The discrete nanoparticles are formed at sufficiently high concentrations of Fe<sup>3+</sup> ions in catechin solutions. The methods used were UV spectrophotometry, low-gradient viscometry, dynamic light scattering, and atomic force microscopy.

**Key words:** (+)-catechin, DNA, iron ions (III), DNA-iron ions-catechin complexes.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАРАМАГНИТНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И МЕТОДА СПИН-ЭХО ЯМР ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСПОРТА ВОДЫ В КОРНЯХ ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЙ.

Суслов М.А.<sup>1</sup>, Егоров Д.В.<sup>1</sup>, Даминова А.Г.<sup>1</sup>, Анисимов А.В.<sup>1</sup>, Самигуллин Д.В.<sup>1</sup>, Мустафина А.Р.<sup>2</sup>, Бочкова О.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН  
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, РФ

<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН  
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: makscom87@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0620

**Аннотация.** В работе представлены результаты использования метода спин-эхо ЯМР с применением нового типа МРТ-флуоресцентных контрастных агентов для исследования характеристик транспорта воды в тканях корней растений. Двойное контрастирование обеспечено включением как флуоресцентных, так и парамагнитных компонентов в силикатные наночастицы. Цель использования данного методического подхода заключается в демонстрации возможности исследования интенсивности транспорта воды в корнях селективно по симпластному (из клетки в клетку через плазмодесмы) и апопластному (внеклеточному) путям водного переноса. Флуоресцентные свойства наночастиц позволили исследовать скорость их проникновения и характер распределения в тканях корня кукурузы. Было показано, что частицы относительно быстро проникают и распределяются по апопласту корня, но при этом не проникают внутрь клеток, по крайней мере, в течение 1,5-2 часов, что являлось необходимым условием для проведения ЯМР экспериментов. В работе использовали два вида наночастиц с парамагнитным ядром на основе марганца и оксида железа. Было показано, что водные растворы наночастиц обладают показателями релаксивности приемлемыми для разделения внеклеточной и внутриклеточной воды в тканях корня по временам магнитной релаксации после часовой инкубации корней растений в растворах наночастиц. Контроль скорости проникновения наночастиц в апопласт корня с помощью конфокальной микроскопии был использован для демонстрации возможностей для качественной оценки интенсивности апопластного транспорта воды в корне. Таким образом, по сравнению с хорошо известными и использованными нами ранее видами МРТ-контрастантов на основе гадолиния, марганца и др., очевидным преимуществом использования парамагнитных флуоресцентных наночастиц в исследовании транспорта воды в растительных тканях, является возможность их визуализации в тканях, а также отсутствие токсического действия на растения, что также было показано в данной работе.

**Ключевые слова:** транспорт воды в растениях, ядерный магнитный резонанс, спин-спиновая релаксации, парамагнитные флуоресцентные наночастицы, апопласт, симпласт.

Проблема транспорта воды в растениях продолжает занимать внимание многих исследователей, и прежде всего потому, что транспорт воды в наибольшей степени определяет рост и продуктивность растений [1]. Внутри данной проблемы важную часть занимает функционирование корневой системы. Композитная модель транспорта воды в корнях растений, впервые предложенная Э. Штейдлом [2] и предполагающая существование трёх параллельных путей транспорта воды в корне (апопластного, симпластного и трансмембранного), не перестаёт быть актуальной и по сегодняшний день. Однако появление новых экспериментальных данных о функционировании корневой системы растений привело к необходимости усовершенствования классической модели транспорта воды [3]. Модель дополнялась новыми водопроводящими, регуляторными и барьерными элементами с учётом гидравлической архитектуры корня. В рамках модифицированной модели акцентированное внимание уделено роли аквапоринов в трансмембранном переносе воды [4], исследованию гидроструктурирования [5], гидротропизма [6], роли апопластных барьеров [7,8], а также заострили внимание на необходимости количественной оценки общих принципов гидравлики воды, начиная с уровня клеток корня. Следующий шаг в усовершенствовании композитной модели транспорта воды предложен в виде модели МЕСНА (Model of Explicit Cross-section Hydraulic Anatomy) [9]. МЕСНА представляет собой гидравлическую модель, которая рассчитывает поток воды через клеточные стенки, мембраны и плазмодесмы каждой отдельной клетки по всему поперечному срезу корня. Интересно, что данная модель предсказывает высокую чувствительность суммарной гидравлической проводимости корня к апертуре плазмодесм. Однако значения гидравлической проводимости плазмодесм и клеточных стенок в наименьшей степени подкреплены экспериментальными данными по сравнению со значениями параметров водного переноса через мембраны клеток. Связано это, в первую очередь, с методическими и техническими сложностями для количественной оценки вышеприведённых параметров.

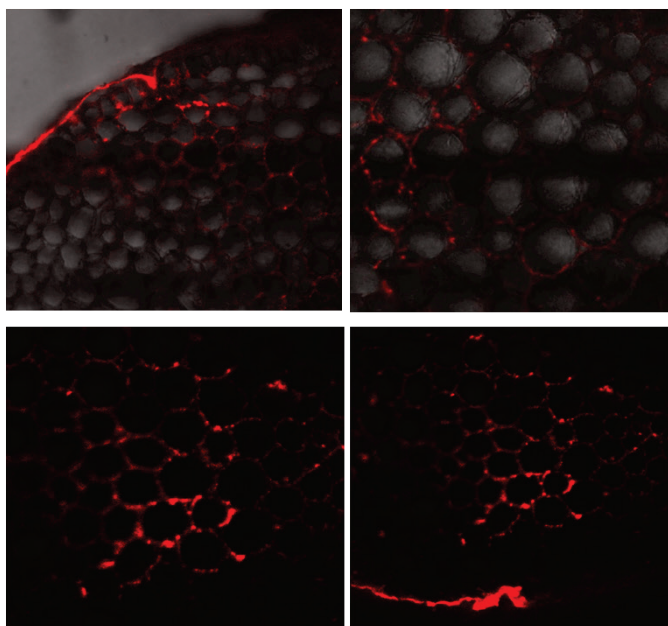
В работе Анисимова и Гусева [10] для исследования переноса воды селективно по симпласту в равновесных условиях без применения внешних движущих сил впервые было предложено использовать метод спинового эха ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (градиентный ЯМР) в сочетании с парамагнитным допингом.



**Рисунок 1.** Климатические камеры роста растений с контролем температуры, относительной влажности воздуха и концентрации углекислого газа. Камеры имеют возможность сопряжения с ЯМР оборудованием и газовой системой для непрерывного исследования параметров водного переноса при одновременном воздействии на растения стрессовых факторов

Суть подхода построена на предварительной селекции симпластного переноса из суммарного межклеточного с помощью парамагнитных ионов, с последующим измерением эффективного коэффициента трансляционной диффузии градиентным ЯМР. Одна из ценностей этого подхода в том, что и селекция, и контроль симпластного переноса проводятся одновременно в рамках единого метода. Для реализации этого подхода до измерения диффузии во внеклеточное пространство ткани корня подается парамагнитный комплекс (парамагнитный допинг) – парамагнитные ионы высокой релаксационной эффективности, которые не проникают в клетки и, соответственно, в плазмодесмы. Парамагнитные ионы ускоряют процесс магнитной релаксации воды, и тем самым исключают в регистрируемом диффузионном затухании эха вклад от воды межклеточного пространства. Иными словами, при входе/выходе из клетки в межклетники, молекулы воды с точки зрения наблюдения ЯМР сигнала становятся «невидимыми». В тоже время перенос по симпласту, куда парамагнетик не проходит, остается наблюдаемым и к сигналу, симпластной воды может применяться вся методика ЯМР контроля трансляционной диффузии. Основными парамагнитными комплексами, которые мы использовали ранее для неинвазивной оценки симпластного и апопластного транспорта воды в корнях растений, были комплексы на основе гадолиния (GdDTPA) и марганца (MnDCTA) [11]. Оба комплекса показали вполне адекватные результаты с точки зрения их применимости в качестве парамагнитного допинга и контрастирования сигналов от внеклеточной и внутриклеточной воды в тканях корня. Однако до сих пор открытым остаётся вопрос о качестве распределения этих контрастантов по внеклеточному пространству, от которого зависит качество селективной оценки водного переноса по симпластной системе корня. В этой связи была поставлена задача использовать сходные по своему функционалу парамагнитные комплексы, распределение которых в тканях корня растений дополнительно можно было бы визуально отслеживать. Такие комплексы были синтезированы и предоставлены коллегами из института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН. Комплексы представляют собой наночастицы довольно сложной структуры с парамагнитным ядром на основе марганца или оксида железа, покрытые флуоресцентной оболочкой из рутения и внешней силиконовой оболочкой. Наночастицы имеют средний диаметр 30 нм. Более подробно характеристики наночастиц описаны в работах [12,13]. Таким образом, цель данной работы состояла в тестировании парамагнитных флуоресцентных наночастиц в качестве парамагнитного допинга для селективной оценки водного переноса по симпластной системе через плазмодесмы. Однако, как будет показано далее, при определённых условиях наночастицы могут быть использованы для качественной оценки интенсивности апопластного транспорта воды в корнях растений, что делает возможным более комплексное исследование процессов транспорта воды в корнях растений с использованием наночастиц. Все эксперименты с наночастицами проводили на 5-7-дневных растениях кукурузы, выращенных в климатических камерах с контролем температуры, влажности, освещённости и концентрации углекислого газа (рис. 1).

На первом этапе был исследован характер проникновения и распределения наночастиц в тканях корня кукурузы. С использованием метода конфокальной микроскопии нами было показано, что наночастицы довольно быстро проникают в апопласт корня, но при этом не проникают внутрь клеток (рис. 2). За 1,5 часа инкубирования в водных растворах наночастиц они успевают проникнуть во внеклеточное пространство вглубь практически всей паренхимы корня. Относительно высокая скорость проникновения наночастиц с одной стороны связана с

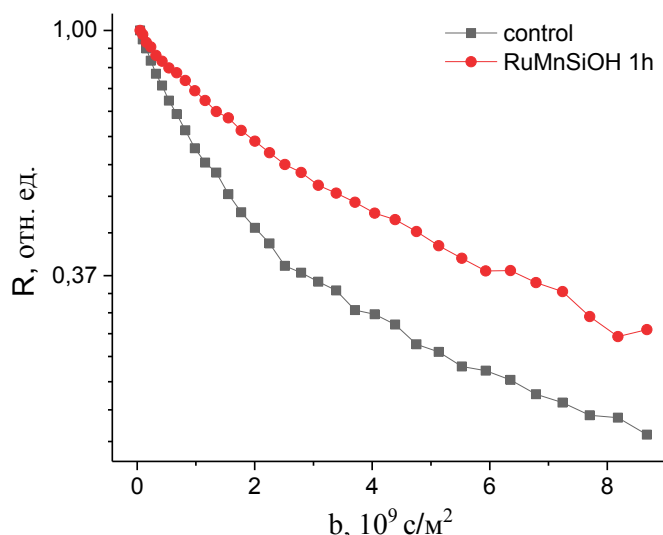


**Рисунок 2.** Поперечные срезы корней кукурузы из зоны всасывания после 1,5-часового инкубирования корней интактных растений в водном растворе наночастиц  $\text{RuFe}_3\text{O}_4\text{SiNH}_2$  с концентрацией 3 г/л. Флуоресценция наночастиц показана красным цветом

их малыми размерами, а с другой стороны с движущей силой транспирации, так как растения инкубировали в интактном состоянии без изменения условий выращивания.

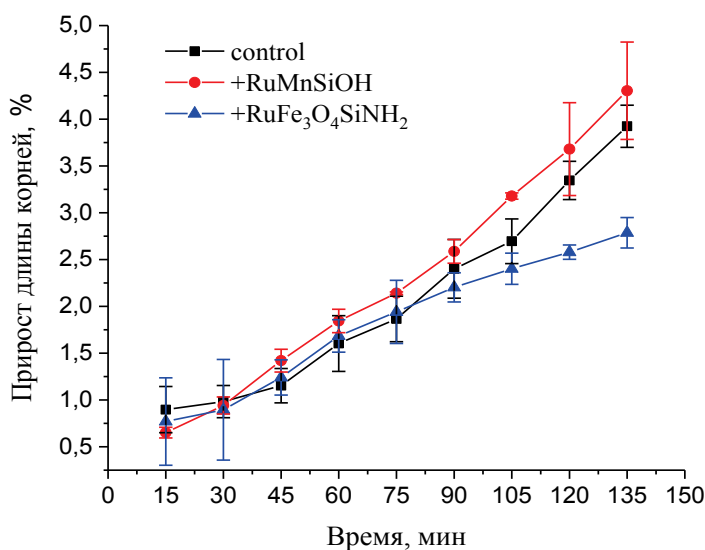
Таким образом, быстрое и достаточно равномерное распределение наночастиц во внеклеточном пространстве корня и не проникновение их в клетки, по крайней мере, в течение 1,5-2 часов инкубирования, делает эти частицы пригодными для использования в качестве парамагнитного допинга в рамках исследования симпластного транспорта воды. Далее встаёт вопрос о качестве контрастирования внеклеточного и внутриклеточного континуумов по временам магнитной релаксации, которое зависит, в частности, от параметров релаксивности растворов с наночастицами при достижении конечной концентрации в тканях корня. На этом этапе для сравнительного анализа действия парамагнитного допинга мы провели ЯМР эксперименты с наночастицами аналогичные предыдущим с использованием вышеуказанных МРТ-контрастантов на основе гадолиния и марганца. На рисунке 3 приведены диффузионные затухания сигналов намагниченности от образца корня кукурузы в контроле и после часового инкубирования корней в растворах с наночастицами на основе марганца с концентрацией 12 г/л. Как видно из рисунка, диффузионное затухание для контрольного образца (без наночастиц) имеет отчётливый двухкомпонентный характер, при этом диффузионное затухание для образца с внедрёнными во внеклеточное пространство наночастицами имеет преимущественно однокомпонентный вид. В данном случае, исчезновение начальной, быстроспадающей компоненты, которую зачастую соотносят с внеклеточным или апопластным компартментом тканей корня, связано с подавлением ЯМР сигнала от внеклеточной воды вследствие её взаимодействия с парамагнитными наночастицами. Таким образом, даже качественное сравнение диффузионных затуханий свидетельствует об эффективности действия парамагнитных наночастиц на основе оксида железа внедрённых в апопласт корня. Стоит отметить, что в аналогичном эксперименте с наночастицами на основе оксида железа эффект их парамагнитного действия был выражен в меньшей степени, несмотря на то, что по данным конфокальной микроскопии частицы отчётливо проникали и распределялись по внеклеточному пространству (данные не приведены). Скорее всего, это связано с более низкой концентрацией раствора, которая составляла 3 г/л. Стоит отметить, что данная концентрация была максимальной из доступных.

Возможно, что для достижения подходящего эффекта действия наночастиц на основе оксида железа требуется больше времени инкубирования корней в растворе с наночастицами или увеличение их концентрации. Однако, как показали результаты измерения скорости роста корней растений, как параметра, являющегося индикатором физиологического состояния растений, при данной концентрации (3г/л) через 1,5 часа инкубирования происходит замедление роста корней (рис. 4). При этом, в случае с частицами на основе марганца в концентрации 12 г/л, что в 4 раза больше, ингибирование роста не наблюдается даже через 2,5 часа инкубирования. С одной стороны, ингибирование роста могло быть связано с токсическим действием частиц на основе оксида железа, с другой стороны ингибирование роста могло быть вызвано механическим закупориванием апопласта корня, вследствие которого происходило снижение поступления воды, необходимой для нормального роста корня.



**Рисунок 3.** Диффузионные затухания намагниченности воды в корнях растений кукурузы в контроле (без наночастиц) и после часового инкубирования корней интактных растений кукурузы в растворе с наночастицами на основе марганца с концентрацией 12 г/л. Диффузионные затухания представляют зависимость амплитуды сигнала спин-эха (R) от величины градиента магнитного поля. Параметр b является комплексным. Диффузионные затухания получены при максимально возможном значении времени диффузии 700 мс

Таким образом, по совокупности полученных результатов можно заключить, что парамагнитные флуоресцентные наночастицы могут быть достаточно эффективно использованы в качестве парамагнитного допинга в ЯМР исследованиях транспорта воды в корнях растений, с возможностью исследования интенсивности водного переноса селективно по симпластной системе корня. К очевидным преимуществам использования данных комплексов наночастиц можно отнести возможность контроля их проникновения в ткани корня растений методом конфокальной микроскопии, а также и методом ЯМР по скорости снижения сигнала намагниченности от образца. Более того, это преимущество, а также тот факт, что частицы не проникают внутрь клеток, можно использовать для качественной оценки интенсивности апопластного переноса воды в корнях при действии на растения различных абиотических факторов, например, водного дефицита, изменения влажности воздуха, освещённости и т.д. В целом, это даёт возможность для более комплексного исследования процессов транспорта воды в растениях. Из двух типов использованных в работе парамагнитных флуоресцентных наночастиц, наиболее приемлемыми по скорости проникновения в ткани корня, подавления ЯМР сигнала от внеклеточной



**Рисунок 4.** Прирост длины корней интактных растений кукурузы в ходе инкубирования корней в обычном питательном растворе (control), водном растворе наночастиц на основе оксида железа ( $\text{RuFe}_3\text{O}_4\text{SiNH}_2$  в концентрации 3 г/л) и в водном растворе наночастиц на основе марганца ( $\text{RuMnSiOH}$  в концентрации 12 г/л)

воды, а также отсутствие влияние на рост растений, являются частицы на основе марганца. К недостаткам использования подобных комплексов наночастиц, возможно, следует отнести более трудоёмкий процесс их синтеза.

*Работа поддержана грантом № 22-74-10087 Российского научного фонда (<https://rscf.ru/en/project/22-74-10087/>). Часть работы выполнена с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.*

**Список литературы / References:**

1. Kramer P.J. *Water relations of plants*. New-York: Academic Press, 1983, 489 p.
2. Steudle E. Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant Soil.*, 2000, vol. 226, pp. 45-56.
3. Kim Y.X., Ranathunge K., Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. Composite transport model and water and solute transport across plant roots: an update. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, no. 193, doi: 10.3389/fpls.2018.00193.
4. Maurel C., Boursiac Y., Luu D.T., Santoni V., Shahzad Z., Verdoucq L. Aquaporins in plants. *Physiol. Rev.*, 2015, vol. 95, pp. 1321-1358.
5. Bao Y., Aggarwal P., Robbins N.E., Sturrock C.J., Thompson M.C., Tan H.Q., Tham C., Duan L., Rodriguez P.L., Vernoux T. Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2014, vol. 111, pp. 9319-9324.
6. Dietrich D., Pang L., Kobayashi A., Fozard J.A., Boudolf V., Bhosale R., Antoni R., Nguyen T., Hiratsuka S., Fuji N. Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nat. Plants*, 2017, vol. 3, p. 17057.
7. Barberon M., Vermeer J.E.M., De Bellis D., Wang P., Naseer S., Andersen T.G., Humbel B.M., Nawrath C., Takano J., Salt D.E., Geldner N. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell*, 2016, vol. 164, pp. 447-459.
8. Doblaz V.G., Smakowska-Luzan E., Fujita S., Alassimone J., Barberon M., Madalinski M., Belkhadir Y., Geldner N. Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science*, 2017, vol. 355, pp. 280-284.
9. Couvreur V., Faget M., Lobet G., Javaux M., Chaumont F., Draye X. Going with the Flow: Multiscale Insights into the Composite Nature of Water Transport in Roots. *Plant. Physiol.*, 2018, vol. 178, pp. 1689-1703.
10. Anisimov A.V., Evarestov A.S., Ionenko I.F., Gusev N.A. Pulsed NMR method for estimation of intercellular water transport on symplasm. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1983, vol. 271, 1246-1249.
11. Anisimov A.V., Suslov M.A. Estimating the MRI contrasting agents effect on water permeability of plant cell membranes using the  $^1\text{H}$  NMR gradient technique. *Applied Magnetic Resonance*, 2021, vol. 52, no. 3, pp. 235-246, doi: 10.1007/s00723-021-01313-6.
12. Fedorenko S., Stepanov A., Sibgatullina G., Samigullin D., Mukhitov A., Petrov K., Mendes R., Rummeli M., Giebler L., Weise B. Fluorescent Magnetic Nanoparticles for Modulating the Level of Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in Motoneurons. *Nanoscale*, 2019, vol. 11, pp. 16103-16113.
13. Fedorenko S., Stepanov A., Bochkova O., Kholin K., Nizameev I., Voloshina A., Tyapkina O., Samigullin D., Kleshnina S., Akhmadeev B., Romashchenko A., Zavjalov E., Amirov R., Mustafina A. Specific nanoarchitecture of silica nanoparticles codoped with the oppositely charged  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ru}^{2+}$  complexes for dual paramagnetic-luminescent contrasting effects. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2023, vol. 49, p. 102665.

**USING OF PARAMAGNETIC FLUORESCENT NANOPARTICLES AND SPIN-ECHO NMR FOR A COMPREHENSIVE STUDY OF WATER TRANSPORT IN THE ROOTS OF INTACT PLANTS****Suslov M.A.<sup>1</sup>, Egorov Ju.V.<sup>1</sup>, Daminova A.G.<sup>1</sup>, Anisimov A.V.<sup>1</sup>, Samigullin D.V.<sup>1</sup>, Mustafina A.R.<sup>2</sup>,  
Bochkova O.D.<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center RAS  
*Lobachevskogo str., 2/31, Kazan, Russia*<sup>2</sup> Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Federal Research Center Kazan Scientific Center RAS  
*Lobachevsky str., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru*

Received 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0620

**Abstract.** The paper presents the results of using the NMR spin-echo method with a new type of MRI contrast agents in the form of fluorescent paramagnetic nanoparticles to study the characteristics of water transport in plant root tissues. Double contrasting is provided by the inclusion of both fluorescent and paramagnetic components in silicate nanoparticles. The purpose of using this methodological approach was to selectively assess the intensity of water transport in plant roots selectively by the symplast (from cell to cell via plasmodesmata) and apoplastic (extracellular) pathways of water transport. The fluorescent properties of nanoparticles made it possible to study the rate of their penetration and the nature of their distribution in root tissues. It was shown that the particles penetrate relatively quickly and are distributed over the root apoplast, but do not penetrate into the cells, at least for 1.5-2 hours, which was a necessary condition for the NMR experiments. We used two types of nanoparticles with a paramagnetic core based on manganese and iron oxide. It was shown that aqueous solutions of nanoparticles have relaxivity parameters acceptable for separating extracellular and intracellular water in root tissues according to magnetic relaxation times after one hour of incubation of plant roots in solutions. This made it possible to “turn off” the signal from extracellular water and then, using the gradient NMR technique, to study water transport selectively by the root symplast. The control of the rate of penetration of nanoparticles into the root apoplast using confocal microscopy was used to demonstrate the possibilities for a qualitative assessment of the intensity of apoplastic water transport in the root under the action of various types of stress, for example, water deficiency, change of light intensity and air humidity. Thus, compared with well-known types of MRI contrast agents based on gadolinium, manganese, etc., the obvious advantage of using paramagnetic fluorescent nanoparticles in the study of water transport in plant tissues is the possibility of their visualization in tissues, as well as the absence of toxic effects on plants, which was shown in this work.

**Key words:** *water transport in plants, nuclear magnetic resonance, spin-spin relaxation time, paramagnetic fluorescent nanoparticles, apoplast, symplast.*

## СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ. ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ КАТАЛИЗАТОРА ЦИТОХРОМА C В КОМПЛЕКСЕ С КАРДИОЛИПИНОМ.

Левченко И.Н.<sup>1,3</sup>, Владимиров Г.К.<sup>2</sup>, Володяев И.В.<sup>3</sup>, Владимиров Ю.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
ул. Трубецкая, 8, г. Москва, 119991, РФ

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
ул. Колмогорова, 1, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0621

**Аннотация.** При помощи метода хемилюминесценции люминола для липидно-мембранной среды, которая является конденсированной, проанализированы процессы перекисного окисления липидов, точки ферментативной активности, квантовые выходы, структура, функции активированной природными красителями флуоресцентными зондами кумарином C-334 или кумарином C-525 хемилюминесценции под действием гетерогенного катализатора комплекса цитохрома C с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении. Показано, точки ферментативной активности и квантовые выходы значительно выше в присутствии физического активатора флуоресцентного зонда природного красителя кумарина C-525, чем в случае собственного не активированного свечения или в случае природного красителя физического активатора флуоресцентного зонда кумарина C-334. Ферментативная активность зависит не только от концентрации цитохрома C в составе гетерогенного катализатора комплекса цитохрома C с кардиолипином, но и от количественного соотношения определяемого прямо пропорциональной зависимостью в процентах между его нативной и частично денатурированной формами.

**Ключевые слова:** Флуоресцентные зонды, цитохром C, кардиолипин, ферментативная активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохром C – элемент дыхательной цепи митохондрий, переносящий электроны с комплекса 3 на комплекс 4, хороший антиоксидант и один из главных биорегуляторов апоптоза по митохондриальному пути [1,2], участвующий в ниже перечисленной системе процессов: (1) образование комплекса цитохрома C с кардиолипином внутренних мембран митохондрий; приобретение им ферментативной активности [3,4]; (2) активация процессов перекисного окисления липидов мембран за счет ферментативной активности цитохрома C и кардиолипина; (3) эволюция состояния и проницаемости митохондриальных мембран за счет процессов перекисного окисления липидов; образование крупных пор; набухание матрикса митохондрий [1,5]; (4) выходы комплекса цитохрома C и кардиолипина в цитоплазму, что приводит к активации каскада ферментативных реакций, которая заканчивается апоптозом [6,7].

Образование комплекса цитохрома C с кардиолипином и приобретение им ферментативной активности рассмотрены в работах [6,8]. Этот комплекс образует наночастицы диаметром 8-11 нм, которые освобождаются центрифугированием и имеют стандартный размер и структуру. Таким образом, комплекс цитохром C с кардиолипином подходит под описание гетерогенного катализатора.

В нашей работе рассмотрено: (1) образование гидрофобных нанокристаллов определенного размера с установленным соотношением количества молекул цитохрома C с кардиолипином, показывающее образование данного комплекса со строго определенной структурой [1,9]; (2) изменение конформации цитохрома C по отношению к нативному состоянию, т.е. увеличение размера его глобулы внутри комплекса цитохрома C с кардиолипином, отдаление тирозиновых и триптофановых остатков от гема, разрыв связи Fe(heme)···S(Met80); повышение досягаемости гема для малых молекул, необходимое для протекания исследуемых липопероксидазной и липоксигеназной реакций [6,10].

Исследование посвящено моделированию процессов перекисного окисления липидов, точек ферментативной активности, квантовых выходов, структуры, функций цитохрома C с кардиолипином и сопровождающей их хемилюминесценции, запускаемых данным комплексом в мембране. Создание точной, оптимальной модели этих процессов позволит использовать методы хемилюминесценции, как инструмент строгой оценки структуры, ферментативной активности комплекса цитохрома C с кардиолипином и, таким образом детальнее исследовать его функции в различных условиях.

Процессы перекисного окисления липидов включают в себя десятки различных реакций, группирующиеся в стадии иницирования, продолжения, разветвления цепи и ее обрыва. Спонтанная хемилюминесценция сопровождает реакции рекомбинации перекисных радикалов и некоторые другие, более специфические процессы с их участием. Использование физических активаторов, таких как флуоресцентные зонды кумарины



C-334 и C-525 позволяет усилить это свечение на 2–3 порядка без изменения химических процессов, протекающих в системе.

Кумарины перехватывают возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов, образующихся при рекомбинации перекисных радикалов по механизму Рассела и, при этом, имеют квантовые выходы хемилюминесценции на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны [3,9]. Таким образом, хемилюминесценция, активированная любым из природных красителей кумаринов C-334 и C-525 имеет интенсивность на порядки выше, чем спонтанная хемилюминесценция липидов, но при этом не отличается от нее по кинетическим кривым, константам скорости и, соответственно, может быть использована при составлении модели активированной флуоресцентными зондами C-334 и C-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома C и кардиолипина. Надежность решения определялась наличием кардиолипина для стабилизации pH [11], гашением  $Fe^{2+}$  [4,12] и наличием физического активатора кумарина C-334 и C-525. Среди факторов, которые могут исказить значение, можно выделить недостаточное добавление пероксида водорода [3,12], избыточное количество азота (II) [1,14], метанола, денатурация белка [1,15], изменение конформации цитохрома C в комплексе цитохрома C с кардиолипином [8,16].

На основании анализа полученных нами параметров цитохрома C с кардиолипином, физического активатора C-334, физического активатора C-525, пероксидазы хрена и люминола, проведены исследования сравнения сенсibiliзирующей способности люминола, природных красителей: кумарина C-334 и кумарина C-525 [1,15], с целью уточнения, структуры, функций, точек ферментативной активности и квантовых выходов комплекса. Полученные результаты представляют практический интерес для изучения сенсibiliзирующей активности природных красителей кумаринов, структуры, функций ферментативной активности комплекса, как катализатора.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные реактивы:  $KH_2PO_4$ , 20 мМ буферный раствор (pH 7,4); пероксид водорода (Sigma-Aldrich, США); кумарин C-334 (Sigma-Aldrich, США); кумарин C-525 (Sigma-Aldrich, США); цитохром c (Sigma-Aldrich, США); кардиолипин из сердца быка (Avanti Polar Lipids, США) [1];

Хемилюминесценцию измеряли на хемилюминометрах Lum-100 (Россия). Спектры поглощения регистрировали с использованием двухлучевого спектрофотометра Analytic Jena SPECORD 200 (Германия). Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu Corporation, Япония). Измерения динамического светорассеяния проводились на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Данные, полученные хемилюминесцентными и спектроскопическими методами, обрабатывали в Microsoft Office Excel. Данные по динамическому светорассеянию обрабатывали с помощью официального программного обеспечения Malvern «Zetasizer Software».

Объектами исследования выступили известный флуоресцентный зонд кумарин C-334, флуоресцентный зонд кумарин C-525, пероксидаза хрена, люминол и комплекс цитохрома C с кардиолипином. Работа проводилась на кафедре медицинской биофизики Факультета фундаментальной медицины МГУ.

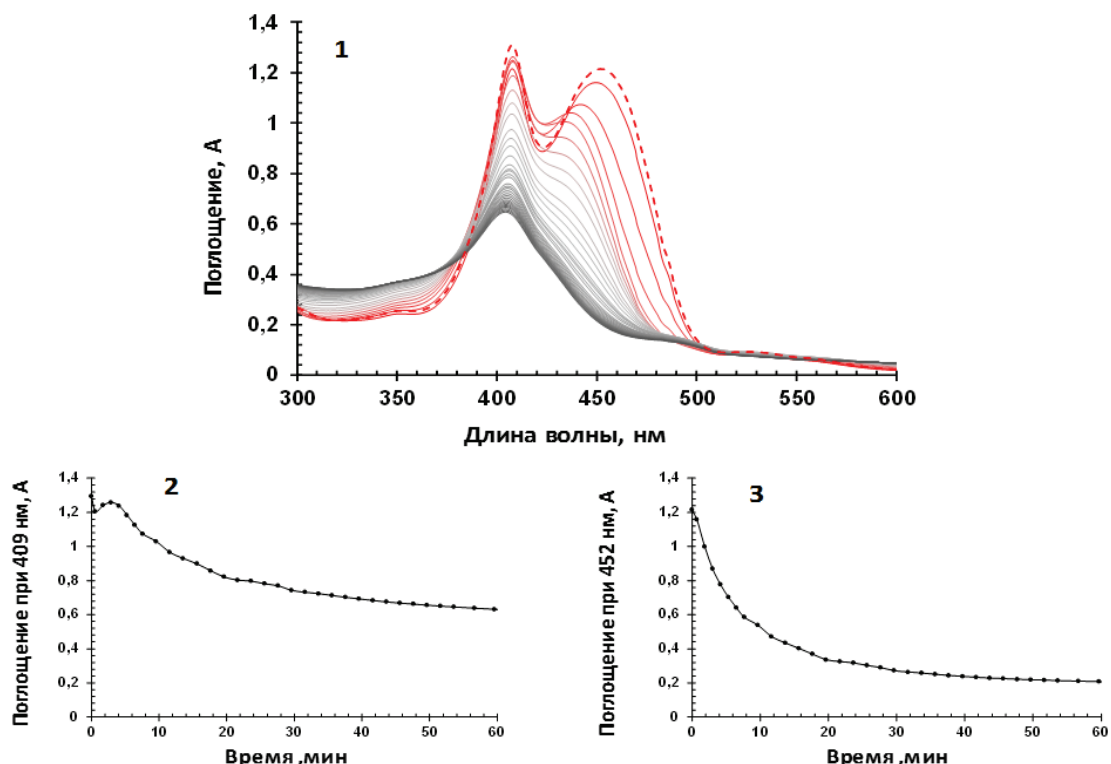
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении ферментативной активности, структуры и функций активированной природными красителями C-334 и C-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома C с кардиолипином были детализированы результаты, полученные в экспериментах по запуску апоптоза [1,9]. Учитывая, что: (1) природные соединения имеют стандартную полосу поглощения интенсивностей с максимумом 699 нм [2]; (2) в кинетических экспериментах свет является распространенным источником возбуждения [12].

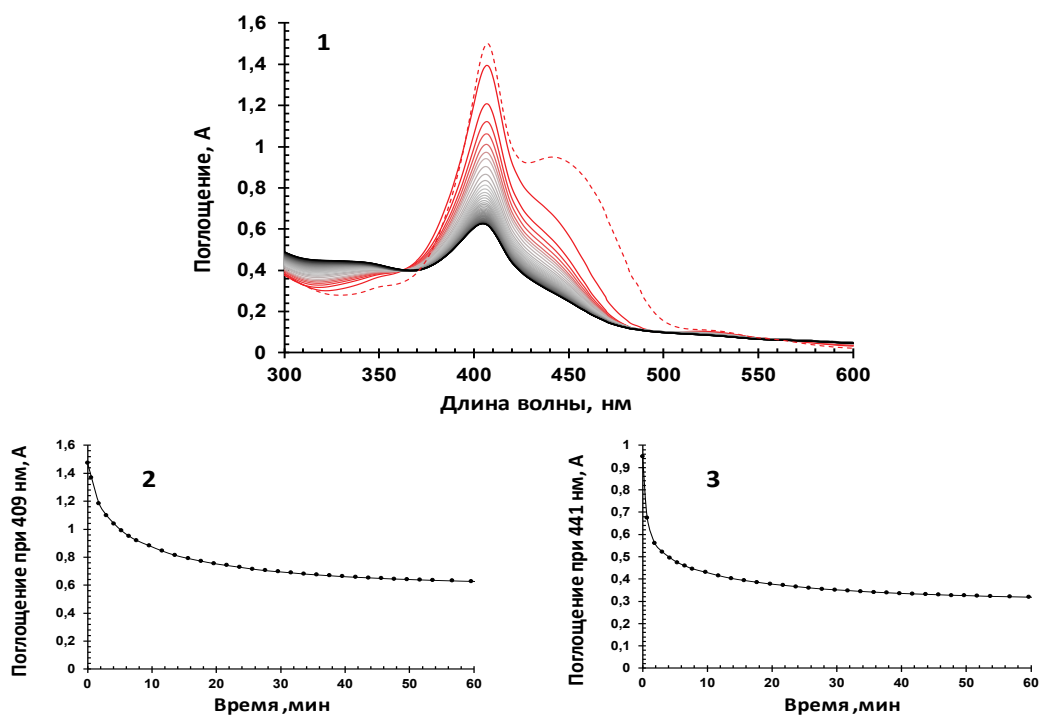
Проанализирована серия спектров поглощения реакционной смеси для более полной оценки происходящих процессов (рис. 1, 2).

Данные по разрушению цитохрома c и флуоресцентного зонда C-334 в ферментативной реакции, катализируемой комплексом цитохром C с кардиолипином, приведены на рисунке 1.

Данные по разрушению цитохрома c и флуоресцентного зонда C-525 в ферментативной реакции, катализируемой комплексом цитохром C с кардиолипином, приведены на рисунке 2. «Классический» активатор C-525, так же как C-334, очень активно окисляется комплексом цитохром C с кардиолипином, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома C, который тоже разрушается в составе комплекса цитохрома C с кардиолипином под действием пероксида водорода (рис. 2, кривые 1, 2 и 3) [5,14,16]. Для оценки расчетов точек ферментативной активности выбран способ, основанный на хемилюминесценции люминола в конденсированной среде, интенсивность которой зависит от концентрации фермента. Количество точек определялась светосуммой. Величина амплитуды зависела от степени полноты фермента в хемилюминесцентной реакции. Для нахождения констант скорости строилась калибровочная кривая зависимости интенсивности. В каждой пробе оценивали квантовый выход хемилюминесценции учитывая скорость реакции. Использовались данные проведенных пяти последовательных измерений степени разрушения



**Рисунок 1.** Результаты измерения серии спектров поглощения реакционной смеси, в которой протекает катализируемая комплексом ферментативная реакция в присутствии С-334. Красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения. 1. Серия спектров поглощения смеси: 10 мкМ цитохром С, 300 мкМ 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипид; 25 мкМ С-334, 215 мкМ  $H_2O_2$ , пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $H_2O_2$ . 2. Изменения значения оптической плотности в полосе Соре. 3. Изменения значения оптической плотности в примерном пике поглощения С-334



**Рисунок 2.** Результаты измерения серии спектров поглощения смеси, в которой протекает катализируемая комплексом ферментативная реакция в присутствии С-525. Красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения. 1. Серия спектров поглощения смеси: 10 мкМ цитохром С, 300 мкМ 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипид; 25 мкМ С-525, 215 мкМ  $H_2O_2$ , пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $H_2O_2$ . 2. Изменения значения оптической плотности в полосе Соре. 3. Изменения значения оптической плотности в примерном пике поглощения С-525

кумаринов в течение 8 мин. Опыты подтверждают, что в случае применения флуоресцентных зондов, физических активаторов кумаринов С-334 и С-525, наблюдается максимальный спектр поглощения флуоресценции при максимальном значении квантового выхода, и природные красители устойчивы к прямому окислению [1,10,13].

Кроме того, при частичной денатурации цитохрома С происходит разрыв связи Fe(heme)···S(Met80) и цитохром С приобретает ферментативную активность. Она выражена в комплексе цитохром С и кардиолипина. «Классический» активатор хемилюминесценции флуоресцентный зонд кумарин С-525, так же как С-334, активно окисляется комплексом цитохром С с кардиолипином, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома с, который тоже разрушается в составе комплекса цитохром С с кардиолипином под действием пероксида водорода (рис. 2, кривые 1,2 и 3).

Для того чтобы сделать правильный анализ квантовых выходов нужно учесть, что: (1) ферментативная активность зависит не только от концентрации цитохрома С, но и от соотношения, определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы; (2) механизм этого усиления хемилюминесценции – перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии (первичного продукта рекомбинации пероксил-радикалов) на флуоресцентный уровень кумарина С-525, или кумарина С-334;

## ВЫВОДЫ

Комплекс цитохрома С с кардиолипином отличается от нативного цитохрома С по следующим свойствам: (1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; (2) теряет поглощение в полосе Core (405–410 нм), отражающей существование связи Fe(heme)···S(Met80); (3) обладает ферментативной активностью и, таким образом, катализирует образование липидных радикалов в мембране. Природный краситель флуоресцентный зонд С-525 – физический активатор хемилюминесценции окисляется цитохромом С с кардиолипином, так же как природный краситель флуоресцентный зонд С-334. Скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома С, который тоже разрушается в составе комплекса цитохрома С с кардиолипином под действием пероксида водорода.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### Список литературы / References:

1. Владимиров Г.К. *Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении*. Диссертация кандидата биологических наук, Москва: Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 2018 [Vladimirov G.K. *Structure and peroxidase function of the cytochrome c complex with cardiolipin in a water environment and in a non-polar environment*. Dissertation of Candidate of Biological Sciences, Moscow: Lomonosov Moscow State University, 2018 (In Russ.)].
2. Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu.A. Activation of Fe<sup>2+</sup>-induced chemiluminescence in human blood low density lipoproteins by the fluorescent dye C-525. *Biofizika*, 1995, vol. 40, no. 2, pp. 428-433.
3. Владимиров Ю.А., Прокурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.А., Осипов А.Н., Каган В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 9, с. 1215-1224 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu., Novikov A.A., Brusnichkin A.A., Osipov A.N., Kagan V.E. Mechanism of activation of cytochrome peroxidase activity with cardiolipin. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 9, pp. 1215-1224 (In Russ.)].
4. Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y. et al. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1808, no. 9, pp. 2147-2155.
5. Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V.E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids. *Free radical biology & medicine*, 2014, vol. 71, pp. 221-230.
6. Владимиров Ю.А., Прокурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.В., Осипов А.Н., Каган В.Е. Кардиолипин активировывает пероксидазную активность цитохрома с, потому что увеличивает доступность железа гема для H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 9, с. 1225-1233 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu., Novikov A.A., Brusnichkin A.V., Osipov A.N., Kagan V.E. Cardiolipin activates cytochrome c peroxidase activity because it increases the availability of heme iron for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 9, p. 1225-1233 (In Russ.)].
7. Skulachev V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett*, 1996, vol. 397, no. 1, pp. 7-10.
8. Владимиров Ю.А., Прокурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах. *БЭБиМ*, 2007, т. 144, № 3, с. 390-396 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu. Chemiluminescence as a method of detection and investigation of free radicals in biological systems. *BABiM*, 2007, vol. 144, No. 3, p. 390-396 (In Russ.)].
9. Vladimirov I.A., Sherstnev M.P., Azimbaev T.K. Chemiluminescence of low density lipoproteins activated by coumarin in the presence of divalent iron ions. *Biofizika*, 1995, vol. 40, no. 2, pp. 323-327.

10. Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine*, 1995, vol. 18, no. 4, pp. 739-745.
11. Vasiljeva O.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. Effect of antioxidants on the kinetics of chain lipid peroxidation in liposomes. *Membrane & cell biology*, 1998, vol. 12, no. 2, pp. 223-231.
12. Владимиров Ю.А., Гутенев П.И., Кузнецов П.И. Математическое моделирование кинетики цепного окисления липидов биомембран в присутствии ионов  $Fe^{2+}$ . *Биофизика*, 1973, т. XVIII, № 6, с. 1024-1029 [Vladimirov Yu.A., Gutenev P.I., Kuznetsov P.I. Mathematical modeling of the kinetics of chain oxidation of biomembrane lipids in the presence of  $Fe^{2+}$  ions. *Biophysics*, 1973, vol. XVIII, no. 6, pp. 1024-1029 (In Russ.)].
13. Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома с с помощью оксида азота и лазерного излучения. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 10, с. 1392-1398 [Osipov A.N., Stepanov G.O., Vladimirov Yu.A., Kozlov A.V., Kagan V.E. Regulation of cytochrome c peroxidase activity using nitric oxide and laser radiation. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 10, pp. 1392-1398 (In Russ.)].
14. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. Образование липо-пероксидных радикалов при окислении кардиопипина в комплексе с цитохромом С. *Биологические Мембраны*, 2009, т. 26, № 6, с. 493-504 [Vladimirov Yu.A., Demin E.M., Proskurnina E.V., Osipov A.N. Formation of lipid-peroxide radicals during oxidation of cardiopipin in complex with cytochrome C. *Biological Membranes*, 2009, vol. 26, no. 6, pp. 493-504 (In Russ.)].
15. Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Basova L.V., Peterson J., Kurnikov I.V., Kagan V.E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 15, pp. 4998-5009.
16. Skulachev V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, 1998, vol. 423, no. 3, pp. 275-280.

#### FREE RADICALS. FEATURES OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF CYTOCHROME C CATALYST IN COMPLEX WITH CARDIOLIPIN

Levchenko I.N.<sup>1,3</sup>, Vladimirov G.K.<sup>2</sup>, Volodyaev I.V.<sup>3</sup>, Vladimirov Yu.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Russian National Research Medical University  
*Ostrovityanova St.1, Moscow, 117997, Russia*

<sup>2</sup>First Moscow State Medical University  
*Trubetskaya str.8, Moscow, 119991, Russia*

<sup>3</sup>Moscow State University

*Kolmogorova str. 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru*

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0621

**Abstract.** Using the luminol chemiluminescence method for the lipid-membrane environment, which is condensed. Both lipid peroxidation processes, points of enzymatic activity, quantum yields, structure, and functions of the natural dye-activated fluorescent probe coumarin C-334 chemiluminescence under the action of a heterogeneous catalyst complex of cytochrome C with cardiolipin in aqueous medium and in a nonpolar environment were analyzed, and processes of lipid peroxidation, points of enzymatic activity, quantum yields, structure, functions of chemiluminescence activated by natural dye fluorescent probe coumarin C-525 under the action of heterogeneous catalyst of cytochrome C complex with cardiolipin in aqueous medium and in nonpolar environment. It is shown that: 1) the enzymatic activity points and quantum yields were significantly higher in the presence of the physical activator fluorescent probe natural dye coumarin C-525 than in the case of its own non-activated luminescence or in the case of the natural dye physical activator fluorescent probe coumarin C-334; 2) an important indicator was that the enzymatic activity depends not only on the concentration of cytochrome C in the heterogeneous catalyst of the complex of cytochrome C with cardiolipin, but also on the quantitative ratio determined by a directly proportional relationship in percent between its native form and partially denatured forms.

**Key words:** *Fluorescent probes, cytochrome C, cardiolipin, enzymatic activity.*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ «СПЛЮСНУТЫЙ СФЕРОИД» ДЛЯ ПРИБЛИЖЕНИЯ ФОРМЫ АКТИВИРОВАННОГО ТРОМБОЦИТА

Литвиненко А.Л., Некрасов В.М., Ястребова Е.С.

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского  
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: roseline.neolis@gmail.com

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0622

**Аннотация.** Определение морфологических параметров одиночных тромбоцитов вызывает не только научный, но и практический интерес для медицинских приложений. Однако корректность определения морфологических параметров тромбоцитов по данным светорассеяния зависит не только от качества исходных экспериментальных данных или применяемого метода решения обратной задачи светорассеяния, но и от используемой оптической модели тромбоцита, в рамках которой ищется оптимальное решение. Явное несоответствие оптической модели и реальной формы измеренной частицы может приводит к неконтролируемым систематическим ошибкам определяемых параметров, что отрицательным образом сказывается на адекватности и корректности выводов проведенного исследования. В данной работе приведены оценки влияния погрешностей такого рода на значения параметров формы для двух частных примеров геометрических форм тромбоцитов. Эти формы заведомо отличались от используемой базовой оптической модели, взятой в виде однородных сплюснутых сфероидов. Первая тестируемая геометрическая форма была основана на биофизической модели поверхности тромбоцита, получаемая при оптимизации площади поверхности с фиксированным внутренним объемом, натянутой на математическую кривую с постоянной кривизной, а вторая геометрическая форма была создана искусственно, на основе сплюснутого сфероида с добавленными вытянутыми половинками эллипсоидов, имитирующих псевдоподии. В качестве экспериментальных данных были взяты численно рассчитанные сигналы светорассеяния с помощью программного пакета ADDA, которые были потом адаптированы к виду сигналов, получаемых при измерениях сигналов светорассеяния на сканирующем проточном цитометре.

**Ключевые слова:** тромбоциты, оптическая модель, обратная задача светорассеяния.

### ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты – это безъядерные форменные элементы крови, играющие важную роль в поддержании гемостаза в организме человека. Несмотря на то, что они были открыты более 150 лет назад, первые детальные систематические исследования формы были предприняты только в 1976 году, с использованием фазово-контрастного микроскопа [1]. Геометрическая форма, выбранная в виде сплюснутого эллипсоида вращения (сплюснутый сфероид), показала наилучшее согласие с экспериментальными данными и до сих пор широко используется в литературе, причем не только для расчета оптических сигналов, но и, например, для моделирования поведения тромбоцитов в потоке жидкости при гидродинамических расчетах [2-3]. Однако очевидно, что данная модель является не более чем удачным приближением биологических объектов, а реальная геометрическая форма и внутренняя структура тромбоцитов является гораздо более сложной, чем однородный сплюснутый сфероид. Для тромбоцитов основными элементами, определяющими их форму, являются субмембранный кортекс и периферическое кольцо микротрубочек. Субмембранный кортекс, представленный спектрином и микрофиламентами, создает поверхностное натяжение [4], а периферическое кольцо микротрубочек, находящееся в динамическом равновесии, растягивает мембрану, придавая ей эллипсоподобную форму [5,6].

Следует отметить, что при описании формы тромбоцитов для объяснения экспериментальных данных, помимо использования простых геометрических моделей, последнее время в литературе предпринимались попытки точно рассчитать геометрическую форму тромбоцитов, исходя из физических соображений минимизации поверхностной энергии, заключенной в мембране, натянутой на периферическое кольцо микротрубочек, которое задается в виде некоторой математической кривой с постоянной кривизной [7].

При активации тромбоцита какими-либо химическими или механическими факторами внутри него запускается ряд сложных биохимических каскадов, приводящих, в частности, к резкому повышению ионов внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , которые влияют на жесткость периферического кольца микротрубочек, что, в свою очередь, влияет на форму активированного тромбоцита [8]. В результате численного моделирования процесса перестройки периферического кольца был получен ряд седловидных геометрических форм, не имеющих осевой симметрии. Данные формы хотя и представляют теоретический интерес, но, к сожалению, слишком сложны для описания наблюдаемых экспериментальных данных.

Более того, повышение концентрации ионов кальция вызывает не только перестройку периферического кольца микротрубочек, но и активацию гельзолина, приводящего к фрагментации микрофиламентов и образованию актиновых нитей, составляющих основу псевдоподий, длина которых сравнима с характерными размерами тромбоцитов [9]. Очевидно, что форма таких активированных тромбоцитов с несколькими

псевдоподиями лежит еще дальше от простых геометрических фигур, чем форма неактивированных тромбоцитов, и делает задачу точного описания формы тромбоцитов почти безнадежной.

В данной работе рассматривается вопрос о том, каким образом приближение сложных форм тромбоцитов (тромбоцит с искривлённым периферическим кольцом или тромбоцит с псевдоподиями) заведомо упрощённой геометрической фигурой – сплюснутым сфероидом – отражается на определяемых параметрах формы исследуемой частицы.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В качестве сигналов, отражающих форму тромбоцита, использовались сигналы светорассеяния. Под сигналами светорассеяния понимаются элементы квадратной матрицы Мюллера  $S_{ij}(\theta, \varphi)$  с размерностью  $4 \times 4$ , которые связывают вектор Стокса падающего опорного излучения и вектор Стокса рассеянного излучения.

Для моделирования сигнала светорассеяния от неоднородных биологических частиц сложной формы стандартные приближенные методы расчетов (приближение Релея, Релея-Ганса-Дебая, Вентцля-Крамерса-Бриллюэна и т.д.) работают плохо, и необходимо применять численные методы, которые дискретизируют уравнения для электромагнитного поля. Один из таких методов, хорошо зарекомендовавший себя на практике – это метод дискретных диполей (МДД), в основе которого лежит представление частицы в виде набора конечного числа точечных диполей, лежащих в узлах кубической решетки, поляризуемость которых определяется локальным показателем преломления. Данный подход реализован в программном пакете ADDA [10], который позволяет моделировать сигналы светорассеяния как от простых предустановленных форм, так и задавать формы самостоятельно с помощью сторонних программ, причём частица может быть неоднородной по внутренней структуре. Все расчёты сигналов светорассеяния в рамках этой работы проводились с использованием этого программного пакета. Поскольку точность и временная сложность численных расчетов явно зависит от степени дискретизации частицы, то для всех расчетов была взята рекомендованная плотность решетки диполей по всем декартовым осям, равная  $l = \frac{\lambda}{10}$ , где  $\lambda$  – длина электромагнитной волны в среде.

В качестве базовой оптической модели тромбоцитов была выбрана модель однородного сплюснутого сфероида, которая описывается четырьмя параметрами:  $D$ ,  $\delta$ ,  $n$  и  $\beta$ , где  $D$  – диаметр сферы с объёмом, равным объёму моделируемого тромбоцита,  $\delta$  – индекс формы,  $n$  – показатель преломления цитоплазмы тромбоцита, а  $\beta$  – параметр, показывающий ориентацию главной оси тромбоцита в пространстве относительно падающего излучения. Область определения параметра  $\delta$   $[0, 1]$ , где 1 соответствует сфере и интерпретируется как полностью активированное состояние, а малые значения  $\delta$  интерпретируется как нативное состояние [3].

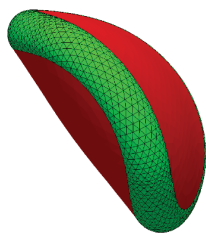
Для того, чтобы найти параметры любой произвольной измеренной частицы, необходимо решить так называемую обратную задачу светорассеяния, которая заключается в нахождении оптимальной модельной частицы, сигнал от которой наилучшим бы образом совпадал с сигналом измеренной частицы. Как правило, данная задача решается следующим образом – сначала выбирается оптическая модель (класс геометрических фигур), в рамках которой будет решаться обратная задача. Далее насчитывается база данных сигналов светорассеяния для данного класса, которая достаточно широка, чтобы покрыть область всех практически важных случаев для исследуемых частиц. Это делается заранее, потому что, как правило, расчет сигнала светорассеяния от одной частицы с помощью МДД может занимать от нескольких секунд до нескольких минут. Далее, методом прямого перебора по всей базе данных ищется такая частица, сигнал от которой наилучшим образом совпадает с сигналом от частицы, параметры которой мы хотим определить. В данной работе были выбраны следующие диапазоны для параметров базы данных сплюснутых сфероидов.

$$\begin{aligned} D &\in [0,75, 4,12] \text{ мкм} \\ \delta &\in [0,1,1] \\ n &\in [1,37,1,39] \\ \beta &\in [60,90]^\circ \end{aligned} \quad (1)$$

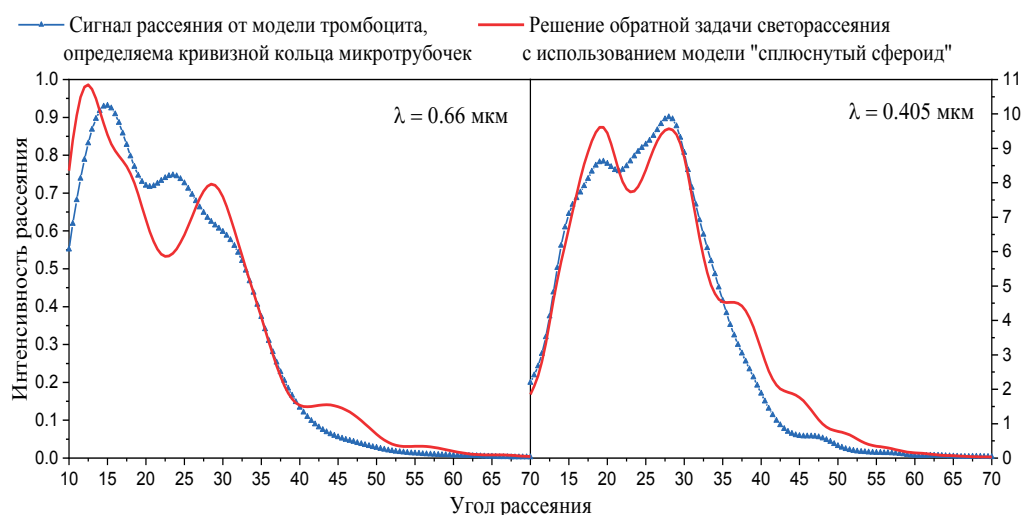
Такой масштаб параметров полностью перекрывают биологический значимый диапазон изменений объема, формы и показателя преломления тромбоцитов, а параметр  $\beta$  выбран таким, исходя из конструктивных особенностей сканирующего проточного цитометра, который включает в себя гидрофокусирующую головку, в которой происходит ориентация несферических частиц вдоль главной оси. Число заранее насчитанных сигналов в базе данных составило 200000 штук, что вполне достаточно для определения наилучшей подходящей частицы с приемлемой точностью.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поскольку точная геометрическая форма нативных и активированных тромбоцитов неизвестна, то результаты обработки тромбоцитов по простой оптической модели в виде однородных сплюснутых сфероидов могут быть подвержены влиянию систематических погрешностей. Вопрос систематических ошибок и погрешностей является весьма нетривиальным, и в данной работе мы пытаемся сделать оценку влияния таких



**Рисунок 1.** Модель тромбоцита, определяемая кривизной кольца микротрубочек. Зелёным обозначено периферическое кольцо микротрубочек, красным мембрана. Параметры модели  $Q = 1,15$ ,  $\frac{V}{R^3} = 2,4$ ,  $\frac{r}{R} = 0,2$



**Рисунок 2.** Решение обратной задачи светорассеяния для оптической модели тромбоцита, определяемой кривизной кольца микротрубочек с использованием базы данных сигналов от сплюснутых сфероидов

погрешностей на определяемые параметры тромбоцитов для двух различных случаев: случая, когда форма тромбоцита полностью определяется искривлением периферического кольца микротрубочек и случаем, когда форма тромбоцита учитывает наличие множества псевдоподий.

**Модель формы тромбоцита, определяемая искривлением периферического кольца кольцом микротрубочек.** Данная модель базируется на следующих допущениях:

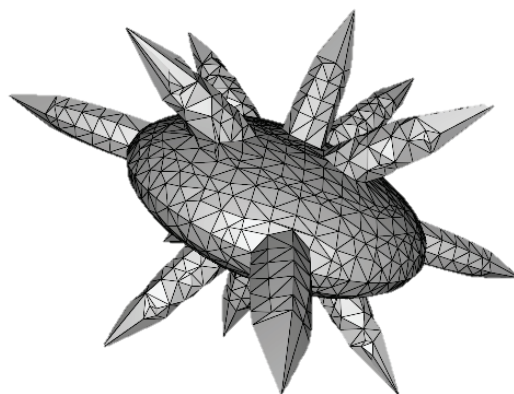
- форма кольца микротрубочек является математической кривой с постоянной кривизной  $Q$
- поверхность мембраны ограничивает фиксированный объем  $V$
- поверхность мембраны тромбоцита является минимальной, при фиксированном  $Q$  и  $R$

Детальное описание модели, методы задания и численный поиск геометрической формы данной модели сделано в работе [7]. На рисунке 1 приведена характерная поверхность для заданной модели, где параметр  $R$  – радиус кольца микротрубочек, а  $r$  – толщина кольца микротрубочек. На рисунке 2 приведены исходные сигналы светорассеяния для подобной частицы, и показаны наиболее похожие на них сигналы из базы данных однородных сплюснутых сфероидов. Расчеты сделаны для двух длин волн, для 0,66 и 0,405 мкм.

Исходные параметры частицы и найденные параметры в рамках модели сплюснутого сфероида приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Решение обратной задачи светорассеяния для модели тромбоцита определяемой кривизной кольца микротрубочек.  $SKO_{отн}$  – относительное среднее квадратичное отклонение между сигналом рассеяния от модели и результатом решения обратной задачи,  $D$  – диаметр сферы эквивалентного объема,  $\delta$  – индекс формы,  $\beta$  – угол ориентации

	$SKO_{отн}$	$D$	$\delta$	$\beta$
Параметры исходной модели		2,6мкм	0,7	75
0,66 мкм				
	0,03	3,2±0,4	0,56±0,14	73±5
0,405 мкм				
	0,015	3,2±0,3	0,47±0,12	77,4±0,8



**Рисунок 3.** Модель тромбоцита с псевдоподиями. Основной объем 9,2 фл, индекс формы  $\delta=0,7$ , каждая из псевдоподий это вытянутый сфероид с объемом 0,128 фл, индекс формы 0,38

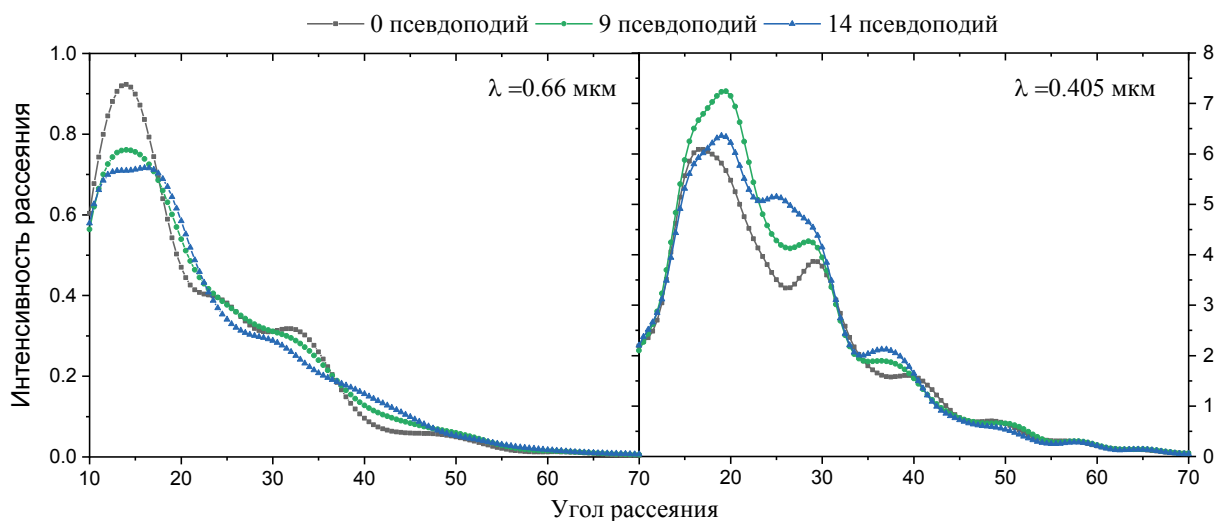
Видно, что для данного набора параметров исходной частицы сложной формы найденные параметры в рамках простой модели сплюснутого сфероида значительно отличаются, особенно для параметра  $D$  и индекса формы  $\delta$ , причем это отличие более значительно для меньшей длин волн. Здесь приведен результат систематической погрешности определения параметров частицы в случае заведомо неправильного выбора оптической модели только для одной частицы, однако из общих соображений понятно, что более короткие длины волн должны лучше “чувствовать” отличия выбранной модели от реальной частицы. Заметим, что подобные длины волн были выбраны не случайно, а исходя из характерных коммерчески доступных лазеров, которыми можно оснастить прибор, измеряющий сигнал светорассеяния от одиночных частиц.

**Модель формы тромбоцита с псевдоподиями.** Другой, практически реализующийся случай значительного отличия формы реального тромбоцита от простой модели сплюснутого сфероида – это наличие длинных вытянутых псевдоподий. Псевдоподии экспериментально наблюдаются у сильно активированных тромбоцитов под воздействием агонистов активации, причем их количество и длина могут сильно варьироваться. Построим следующую модель тромбоцита с псевдоподиями – основой будет служить сплюснутый сфероид, к которому прикреплены значительно меньшие по объему половинки вытянутых сфероидов (см. рис. 3)

Следует отдельно отметить, что несмотря на относительно малый объем, содержащийся в отдельной псевдоподии, их наличие значимо влияет на сигнал светорассеяния, как это показано на рисунке 4, где показано три сигнала – от базового сфероида с 0, 9 и 14 псевдоподиями.

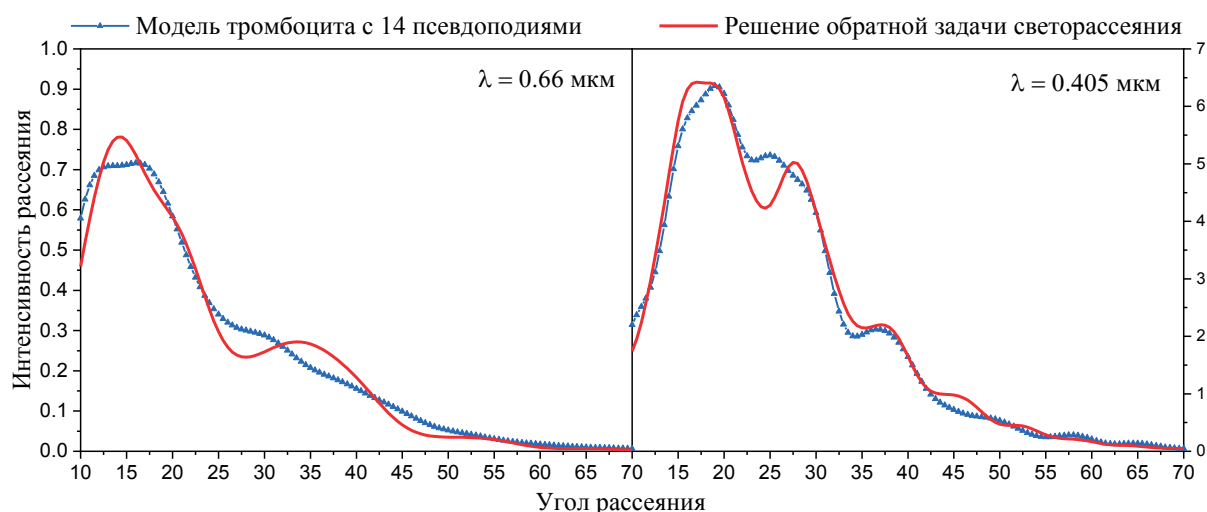
Очевидно, что изменение сигнала светорассеяния при добавлении псевдоподий изменяет оптимальное решение среди класса сплюснутых сфероидов, как это продемонстрировано на рисунке 5.

Найденные оптимальные параметры и погрешности для данного случая искажений реальной частицы от используемой оптической модели отражены в следующей таблице 2.



**Рисунок 4.** Сигнал светорассеяния с 0, 9 и 14 псевдоподиями, на двух длинах волн, 405 и 660 нм





**Рисунок 5.** Решение обратной задачи светорассеяния для оптической модели тромбоцита с 14 псевдоподиями с использованием базы данных сигналов от сплюснутых сфероидов

Как и в случае первой модели тромбоцита, отличие реальной формы от используемой оптической модели может приводить к значительным отличиям найденных параметров от настоящих. Причем, как видно из таблицы 2 на примере с индексом формы для длины волны 0,405 мкм, эти отличия могут носить несистематический характер, когда постепенное усиление отличия реальной частицы от оптической модели приводит к немонотонной зависимости найденного параметра.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы был рассмотрен вопрос о влиянии отличия используемой оптической модели от реальной формы частицы на определение параметров при решении обратной задачи светорассеяния. В качестве оптической модели тромбоцита был взят широко распространенный вариант сплюснутого сфероида, а в качестве реальной модели были выбрано два различных примера. Первый из них базируется на математической модели поверхности тромбоцита с минимальной площадью, натянутой на кольцо микротрубочек, моделируемой кривой с постоянной кривизной, а вторая модель реальной частицы основана на геометрической модели сплюснутого

**Таблица 2.** Решение обратной задачи светорассеяния для модели тромбоцита с псевдоподиями. СКО<sub>отн</sub> – среднеквадратичное отклонение между сигналом рассеяния от модели с псевдоподиями и результатом решения обратной задачи, D – диаметр сферы эквивалентного объема,  $\delta$  – индекс формы,  $\beta$  – угол ориентации

	СКО <sub>отн</sub>	D	$\delta$	$\beta$
Параметры сфероида без псевдоподий.		2.6мкм	0.7	75
0.66 мкм				
Без псевдоподий	0,0005	2,63±0,03	0,69±0,01	74,2±0,7
9 псевдоподий	0,008	2,81±0,16	0,59±0,04	73±3
14 псевдоподий	0,011	2,73±0,15	0,55±0,04	72±2
405 мкм				
Без псевдоподий	0,0008	2,717±0,011	0,6655±0,006	72,9±0,3
9 псевдоподий	0,0018	2,9±0,03	0,561±0,013	79,7±0,4
14 псевдоподий	0,006	3±0,07	0,58±0,03	77,7±0,8

сфероида, на котором расположены несколько других вытянутых сфероидов с гораздо меньшим объемом, имитирующих наличие псевдоподий у активированных тромбоцитов. Решение обратной задачи для обоих случаев показало наличие значительных отклонений найденных параметров от заложенных в реальную частицу, причем характер этих отклонений может быть несистематическим.

#### Список литературы / References:

1. Frojmovic M.M., Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J.*, 1976, vol. 16, no. 9, pp. 1071-1089, doi: 10.1016/S0006-3495(76)85756-6.
2. Chesnutt J.K.W., Han H.-C. Platelet size and density affect shear-induced thrombus formation in tortuous arterioles. *Phys Biol.*, 2013, vol. 10, no. 5, doi: 10.1088/1478-3975/10/5/056003.
3. Litvinenko A.L., Moskalensky A.E., Karmadonova N.A., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Konokhova A.I., Yurkin M.A., Pokushalov E.A., Chernyshev V.A., Maltsev V.P. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets. *Cytometry*, 2016, vol. 89, no. 11, pp. 1010-1016, doi: 10.1002/cyto.a.23003.
4. Hartwig J.H. Chapter 8 - The Platelet Cytoskeleton. *Platelets (Third Edition) ed. Michelson A.D. Academic Press*, 2013, pp. 145-168, doi: 10.1016/B978-0-12-387837-3.00008-0.
5. Patel-Hett S., Richardson J.L. et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 9, pp. 4605-4616, doi: 10.1182/blood-2007-10-118844.
6. White J.G., Rao G.H. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am. J. Pathol.*, 1998, vol. 152, no. 2, pp. 597-609.
7. Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Muliukov A.R., Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Method for the simulation of blood platelet shape and its evolution during activation. *PLOS Computational Biology*, 2018, vol. 14, no. 3, e1005899, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005899.
8. Steiner M., Ikeda Y. Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules. *J. Clin. Invest.*, 1979, vol. 63, no. 3, 443-448, doi: 10.1172/JCI109321.
9. Hartwig J.H. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *Journal of Cell Biology*, 1992, vol. 118, no. 6, pp. 1421-1442, doi: 10.1083/jcb.118.6.1421.
10. Team of core ADDA developers [Electronic resource] *GitHub*.

## EMPLOYING THE OPTICAL MODEL OF AN "OBLATE SPHEROID" TO APPROXIMATE THE SHAPE OF AN ACTIVATED PLATELET

Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Yastrebova E.S

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion

Institutskaya str., 33, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: roseline.neolis@gmail.com

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0622

**Abstract.** The determination of morphological parameters of individual platelets is of great scientific and practical interest in the field of medical applications. However, the accuracy of determining these parameters based on light scattering data depends not only on the quality of the initial experimental data and the methodology used to solve the inverse problem of light scattering, but also on the optical model employed for platelets. The choice of an appropriate optical model is crucial as it directly influences the accuracy of the determined parameters. A significant mismatch between the assumed optical model and the actual shape of the measured particle can introduce uncontrolled systematic errors, thereby compromising the adequacy and validity of the study's findings. This paper focuses on assessing the impact of such errors on the shape parameters using two specific examples of platelet geometric shapes. These shapes were deliberately chosen to deviate from the commonly employed optical model, which assumes uniform oblate spheroids. The first geometric configuration investigated was derived from a biophysical model that represents the morphology of a platelet. This model was obtained through the optimization of surface area while keeping the internal volume constant. The surface was defined by a mathematical curve characterized by a consistent curvature. The second geometric structure was artificially constructed by augmenting an oblate spheroid with elongated halves of ellipsoids, specifically designed to imitate pseudopodia. Numerically calculated light scattering signals obtained through the ADDA software package were used as experimental data, and these signals were subsequently adjusted to resemble the type of signals obtained from light scattering measurements conducted on a scanning flow cytometer.

**Key words:** platelets, optical model, scanning flow cytometry.

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ФЕНОЛОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ

Лаптева Е.А., Кравченко Е.М., Одарюк И.Д., Дорошкевич В.С., Баранова О.В.

Донецкий государственный университет

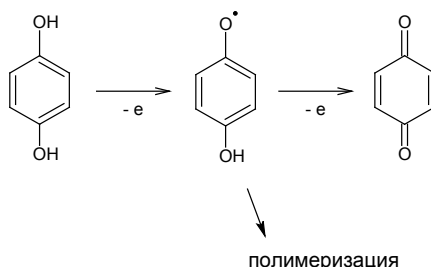
ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283001, ДНР, РФ; e-mail: elen.kravchenko@donnu.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0623

**Аннотация.** Рассмотрена возможность получения спектров поглощения фенолов и продуктов их лакказного окисления методами квантово-химического моделирования. Первичную оптимизацию структур проводили полуэмпирическим методом PM3, а моделирование спектров - в рамках теории функционала плотности методом DFT/B3LYP/6-311G++dp в водной среде в программе Gamess US. Для большинства исследованных фенолов и соответствующих им хинонов расчетными методами получены спектры, содержащие одну полосу поглощения, для некоторых - большее число полос, в то время как в экспериментальных спектрах поглощения этих веществ в диапазоне работы спектрофотометра, как правило, с разной достоверностью видны две полосы. Для большинства веществ длины волн максимумов поглощения расчетных спектров отличаются от экспериментальных не более чем на 10 нм. Расчетные коэффициенты экстинкции, как правило, превышают экспериментальные в 1,5-2 раза. Для фенолов, которые не могут быть непосредственно окислены до хинонов, в качестве продуктов рассмотрены олигомерные продукты. Их расчетные спектры также достаточно хорошо соотносятся с экспериментальным спектром реакционной смеси. Спектральные характеристики, полученные моделированием в указанных условиях, можно использовать для примерной оценки состава реакционной смеси, но для их использования в точном количественном анализе и кинетических исследованиях необходимы дополнительные исследования.

**Ключевые слова:** лакказа, фенолы, хиноны, спектрофотометрия, моделирование.

Лакказа катализирует процесс четырехэлектронного восстановления молекулярного кислорода за счет электронов субстрата-восстановителя. При окислении классических субстратов лакказы, двухатомных фенолов, образуется радикальный промежуточный интермедиат, который в дальнейшем либо ферментативно окисляется до хинона [1], если таковой возможен, либо превращается неферментативно в реакциях рекомбинации или полимеризации [2]. Фермент акцептирует по одному электрону и протону от одной гидроксильной группы субстрата, а дальнейшие превращения могут включать ферментативные и неферментативные стадии:



Фенолы и хиноны, как наиболее вероятные продукты лакказного окисления, имеют характерные полосы поглощения в УФ- и видимой областях спектра. Спектрофотометрический анализ широко используется для изучения кинетики этих процессов, однако он оказывается малоинформативным в случае сложных спектров реакционных смесей. Например, при окислении производных гидрохинона можно достоверно наблюдать как расходование субстрата, так и накопление продукта, а при окислении пирогаллола и галловой кислоты спектр реакционной смеси сложный, наблюдается смещение и наложение полос поглощения, вероятно образование различных промежуточных продуктов. Для таких исследований желательно иметь образцы продуктов окисления или располагать структурными методами анализа. В любом случае, для интерпретации экспериментальных данных и получения кинетических кривых необходимы коэффициенты экстинкции реагентов.

Для вычисления коэффициентов экстинкции пользовались одним из трех следующих способов:

- 1) градуировочный график – коэффициенты экстинкции всех субстратов и *para*-бензохинона, единственного продукта лакказного окисления, который был доступен в виде препарата.
- 2) по величине оптической плотности раствора в конце реакции, когда ее значение почти не меняется, при длине волны, соответствующей продукту, считая превращение полным и концентрацию продукта равной исходной концентрации субстрата. Полученный таким способом коэффициент экстинкции *para*-бензохинона примерно на 15% выше полученного из градуировочного графика;
- 3) по соотношению  $\Delta A/\Delta t$  субстрата и продукта для нескольких временных диапазонов одной кинетической кривой на ее прямолинейном участке. Значение  $\epsilon$ , полученное для *para*-бензохинона, завышено на 40% по сравнению с результатом градуировки.

Таким образом, даже в случае спектральной картины, позволяющей применить косвенные методы определения коэффициента экстинкции продукта, его точность оказывается не слишком высока.

Хиноны, как правило, являются высокорекреационноспособными веществами и достаточно быстро превращаются в неферментативных реакциях, что затрудняет их выделение в неизменном виде. Синтез этих веществ неферментативными методами снова приводит к необходимости выделения и очистки, к тому же нет уверенности, что в других условиях будут получены идентичные продукты. Таким образом, препаративное получение продуктов окисления в рамки исследования не входило.

Целью данной работы было выяснение возможности получения спектров поглощения продуктов окисления фенолов путем квантово-химического моделирования и анализ состава реакционных смесей лакказного окисления на основании спектрофотометрических данных.

**Экспериментальная часть.** Ферментативное окисление фенолов исследовали в присутствии лакказы макромицета *Trametes versicolor* фирмы SIGMA, которую использовали без дополнительной очистки. Субстраты очищали перекристаллизацией из водно-спиртовых растворов или сублимацией. Чистоту указанных реагентов устанавливали по температурам плавления и спектрофотометрически. Цитратный буферный раствор для проведения ферментативного окисления готовили из реагентов надлежащей чистоты по стандартным методикам [3] на бидистиллированной воде.

В работе использовался спектрофотометр SPECORD S300 UV VIS (Германия). Для регистрации сигнала и первичной обработки полученных данных использовали программу WinAspect.

Для получения стандартных спектров субстратов и продуктов применяли квантово-химическое моделирование. Вычисления проводились в рамках теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP в программе Gamess US. Исходные структуры фенолов и продуктов их окисления оптимизировали квантово-химическим методом PM3. На уровне B3LYP/6-311+G(d,p) получены электронные спектры поглощения. Расчеты проведены в водной среде в рамках модели IEFPCM.

**Результаты и обсуждение.** Полуэмпирический метод ZINDO, который раньше рекомендовался для моделирования УФ-спектров [4], не позволяет проводить оптимизацию молекулы. Построение спектра на основании энергии в единственной точке дает три полосы поглощения высокой интенсивности ( $\lambda_{\max 1} = 213$  нм,  $\epsilon_1 = 27000$ ;  $\lambda_{\max 2} = 259$  нм,  $\epsilon_2 = 9000$ ;  $\lambda_{\max 3} = 289$  нм,  $\epsilon_3 = 3000$ ). Полоса  $\lambda_{\max 2} = 259$  нм в экспериментальном спектре отсутствует.

Предварительная оптимизация методом PM3 и расчет методом ZINDO позволяют получить две полосы поглощения, также не совпадающие с экспериментальными ( $\lambda_{\max 1} = 270$  нм,  $\epsilon_1 = 10000$ ;  $\lambda_{\max 2} = 302$  нм,  $\epsilon_2 = 4000$ ).

Более перспективна оптимизация молекулы в рамках теории функционала плотности (DFT) методом TD-SCF с использованием гибридного функционала B3LYP [5]. В нашем случае она дает результаты, весьма близкие к экспериментальным ( $\lambda_{\max 1} = 217$  нм,  $\epsilon_1 = 11000$ ;  $\lambda_{\max 2} = 281$  нм,  $\epsilon_2 = 6000$ ), однако оказывается очень затратной по времени и вычислительной мощности – оптимизация и расчет спектра гидрохинона занимает порядка 12 часов, а более сложных молекул – еще большее время.

При использовании метода PM3 для оптимизации и расчете на уровне B3LYP/6-311+G(d,p) электронный спектр поглощения рассчитывается за время не более 1 часа на том же компьютере. Эти спектры содержат, как правило, только одну полосу поглощения, примерно совпадающую с экспериментальной бензоидной полосой поглощения по величине  $\lambda_{\max}$  похожего вида ( $\lambda_{\max} = 287$  нм,  $\epsilon = 3500$ ). Так как первая этиленовая полоса поглощения в большинстве случаев все равно недоступна для достоверного измерения в условиях проведения кинетики, для расчета выбрали именно такой вариант.

Так как на вид спектров поглощения большое влияние оказывает растворитель [6], важно проводить расчет в среде, близкой к экспериментальной. Расчеты были проведены в водной среде в рамках модели IEFPCM.

Все исследованные фенолы имеют 2 полосы поглощения в диапазоне работы спектрофотометра, высокоинтенсивная этиленовая и немного более слабая бензоидная. Условия работы с ферментом не позволяли достоверно наблюдать первую коротковолновую полосу, в большинстве случаев она не видна или сильно искажена. Вторая полоса во многих случаях подходит для спектрофотометрического наблюдения за расходом субстрата в процессе лакказного окисления.

Оптимизация по методу PM3 с дальнейшим расчетом на уровне B3LYP/6-311+G(d,p) позволяет получить для гидрохинона и большинства его производных, пирокатехина и резорцина только одну, по-видимому, бензоидную полосу поглощения. Для 2,5-дихлоргидрохинона и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты получены 2 полосы поглощения. Для большинства исследованных фенолов наблюдается достаточно хорошее совпадение расчетных длин волн максимумов поглощения с экспериментальными – различие порядка 10 нм. В случае фенолкарбоновых кислот разница намного выше – 50-100 нм, несмотря на учет содержания анионной формы. Возможно, для соединений, содержащих карбоксильные группы, необходимо применять другие расчетные базисы. Расчетные коэффициенты экстинкции в большинстве случаев завышены в 1,5-2 раза (табл. 1).

Таблица 1. Экспериментальные и расчетные спектральные характеристики фенолов

Субстрат	Экспериментальные			Расчетные		
	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм
Гидрохинон	516	236	12			
	2268	289	27	3500	287	40
2,5-дигидроксибензойная кислота	3658	238	10			
	5165	320	41	5000	429	100
2,3-дицианогидрохинон	5012	237	66			
	5238	346	42	7000	344	62
2,5-дибромгидрохинон	1285	237	12			
	3083	310	28	7000	280	35
2,5-дихлоргидрохинон	940	236	12	4000	230	30
	4132	297	89	6000	284	45
метилгидрохинон	-	-	-			
	2814	288	33	4000	283	45
триметилгидрохинон	-	-	-			
	2549	285	26	4500	287	48
третбутилгидрохинон	970	236	4			
	3486	289	32	4000	289	48
пирокатехин	-	-	-			
	2047	275	19	3200	265	36
2,3-дигидроксибензойная кислота	4093	240	10	7800	255	36
	2616	306	47	3200	350	68
4-третбутилпирокатехин	-	-	-			
	2386	278	17	3700	270	40
резорцин	-	-	-	1050	224	24
	2008	273	22	2000	259	38
фенол	-	234	-	50000	191	35
	1378	270	22	5000	253	45
орто-крезол	-	-	-	40000	210	25
	1282	271	13	4500	255	30

Курсив – полоса поглощения сильно искажена поглощением буферного раствора;

«-» - данные полностью недостоверны, но полоса поглощения имеется.

В случае орто- и пара-дигидроксибензолов образование хинонов как основного или единственного продукта окисления достаточно однозначно следует из спектроскопических данных, однако их коэффициенты экстинкции требуют уточнения. Т.е. основным объектом моделирования выступали хиноны.

Образующийся при лакказном окислении гидрохинона *пара*-бензохинон имеет две четко различимые полосы поглощения – ультрафиолетовую высокой интенсивности (246 нм) и малоинтенсивную видимую (420 нм). При моделировании получена только первая полоса поглощения, а для многих других фенолов также получены видимые полосы поглощения. Во многих случаях расчетные длины волн максимумов поглощения также отличаются от экспериментальных примерно на 10 нм, а коэффициенты экстинкции отличаются не более чем в 2 раза (табл. 2).

Для мета-дигидроксибензолов и одноатомных гидроксibenзолов, которые не могут быть окислены до соответствующих хинонов, необходим поиск других возможных продуктов окисления, возникающих при рекомбинации или иных превращениях феноксильных радикалов. Таковыми могут быть димерные, олигомерные и полимерные продукты [7,8].

Используемая программа не предназначена для работы с полимерными соединениями. Максимальная длина олигомера, который удалось оптимизировать и рассчитать спектр – 3 звена. То есть, в колонке расчетных величин под продуктами лакказного окисления резорцина, фенола и орто-метилфенола имеются в виду соответствующие тримеры (табл. 2).

Таблица 2. Экспериментальные и расчетные спектральные характеристики хинонов

Продукт	Экспериментальные			Расчетные		
	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм
Пара-бензохинон (1,4-бензохинон)	18361	246	28	16000	257	30
	20	420	95			
2-карбоксо-1,4-бензохинон	18285	248	30	15000	263	45
	182	420	120	500	378	100
2,3-дициано-1,4-бензохинон	10402	260	36	12000	308	55
	799	445	120			
2,5-дибром-1,4-бензохинон	-	-	-			
	1333	355	100	7500	364	90
2,5-дихлор-1,4-бензохинон	17763	273	26			
	265	340	80	9300	347	70
Метил-1,4-бензохинон	20801	250	170	16000	270	40
	616	325				
Триметил-1,4-бензохинон	22324	261	10	15000	281	40
	500	355				
4-третбутил-1,4-бензохинон	23323	252	15	14000	270	45
	895	323,5		500	381	600
1,2-бензохинон	7124	252		2700	231	45
	1884	390	17	2300	438	100
3-карбоксо-1,2-бензохинон				11000	248	50
	2317	418	37	8000	417	100
4-третбутил-1,2-бензохинон				5400	278	55
	1333	400	93	1400	495	100
продукт окисления резорцина	-	340	120	26000	334	60
продукт окисления фенола	-	270	-	5500	285	40
	2753	400	70	16000	372	90
продукт окисления орто-крезола	-	271	-	12000	270	55
	646	412	80	500	364	80

Таким образом, спектральные характеристики фенолов и соответствующих хинонов, полученные путем моделирования в рамках теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP в программе Gamess US, схожи с экспериментальными, однако недостаточно точны. Погрешность определения максимума поглощения 10 нм и более недопустима при анализе сложного спектра реакционной смеси. Завышенные в два раза коэффициенты экстинкции затруднительно использовать для получения достоверных кинетических данных; с другой стороны, в большинстве случаев это завышение соизмеримо с погрешностью косвенных методов определения коэффициента экстинкции по экспериментальным данным кинетики.

#### Список литературы / References:

1. Thurston C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, vol. 140, pp. 19-26.
2. Catherine H. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 2016, vol. 5, pp. 250-266.
3. Досон Р. *Справочник биохимика*. М.: Мир, 1991, 539 с. [Dawson R. *Biochemist's Handbook*. М.: Mir, 1991, 539 p. (In Russ)].
4. Серба П.В., Блинов Ю.Ф., Мирошниченко С.П. *Квантово-химические расчеты в программе Gaussian Учебное пособие*. Таганрог: Изд-во ТТИ ЮФУ, 2012, 100 с. [Serba P.V., Blinov Yu.F., Miroshnichenko S.P. *Quantum-chemical calculations in the program Gaussian Tutorial*. Taganrog: Publishing House of TTI SFU, 2012, 100 p. (In Russ.)].
5. Albarran G. et al. Absorption Spectrum, Mass Spectrometric Properties, and Electronic Structure of 1,2-Benzoquinone. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2010, vol. 114, iss. 28, pp. 7470-7478.
6. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. *Спектрометрическая идентификация органических соединений*. М.: Мир 1977, 592 с. [Silverstein R., Bassler G., Morrill T. *Spectrometric identification of organic compounds*. М.: Mir 1977, 592 p. (In Russ.)].
7. Sun X. et al. Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, vol. 171, iss. 7, pp. 1673-1680.

8. Романовская И.И. и др. Окисление фенола ковалентно иммобилизованной пероксидазой хрена. *Биотехнология*, 2011, т. 4, № 6, с. 31-35 [Romanovskaya I.I. et al. Oxidation of phenol by covalently immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology*, 2011, vol. 4, no. 6, pp. 31-35 (In Russ.)].

#### SIMULATION OF THE ELECTRONIC ABSORPTION SPECTRA OF PHENOLS AND PRODUCTS OF THEIR ENZYMATIVE OXIDATION

Lapteva E.A., Kravchenko E.M., Odaryuk I.D., Doroshkevich V.S., Baranova O.V.

Donetsk State University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283001, DPR, Russia; e-mail: elen.kravchenko@donnu.ru

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0623

**Abstract.** The possibility of obtaining absorption spectra of phenols and products of their laccase oxidation by quantum-chemical modeling methods is considered. The primary optimization of the structures was carried out by the semi-empirical PM3 method, and the spectra were simulated within the framework of the density functional theory by the DFT/B3LYP/6-311G++dp method in an aqueous medium using the Gamess US program. For most of the studied phenols and their corresponding quinones, spectra containing one absorption band were obtained by calculation methods, for some - a larger number of bands, while in the experimental absorption spectra of these substances in the operating range of the spectrophotometer, as a rule, two bands are visible with different reliability. For most substances, the wavelengths of the absorption maxima of the calculated spectra differ from the experimental ones by no more than 10 nm. The calculated extinction coefficients, as a rule, exceed the experimental ones by 1,5–2 times. For phenols that cannot be directly oxidized to quinones, oligomeric products are considered as products. Their calculated spectra also correlate quite well with the experimental spectrum of the reaction mixture. The spectral characteristics obtained by modeling under these conditions can be used for a rough estimate of the composition of the reaction mixture, but additional studies are needed for their use in accurate quantitative analysis and kinetic studies.

**Key words:** laccase, phenols, quinones, spectrophotometry, simulation.

## КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЕПТИДНЫХ НАНОТРУБОК

Леденева О.Р.<sup>1</sup>, Белова Е.В.<sup>1</sup>, Быстров В.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ул. Колмогорова, 1, г. Москва, 119991, РФ

<sup>2</sup>Институт математических проблем биологии РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН

ул. профессора Виткевича, 1, г. Пуццо, 142290, РФ; e-mail: olyaledenyova2002@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0624

**Аннотация.** В работе представлены расчеты дипольных, полярных и фотоэлектронных свойств, а также энергетических электронных уровней наноструктур на основе дифенилаланина, диизолейцина и дилейцина методами AM1, PM3, RM1 программного обеспечения HyperChem. Расчеты, выполненные в данной статье, необходимы для дальнейшего использования дипептидных нанотрубок для обнаружения озоновых дыр, доставки лекарств или создания молекулярных машин. Показано, что электронные и оптические свойства нанотрубок на основе изолейцина и лейцина соответствуют свойствам дифенилаланиновых нанотрубок, что говорит о возможности применения дилейциновых и диизолейциновых нанотрубок наравне с дифенилаланиновыми нанотрубками. Созданные в процессе работы спиральные модели ближе к реальным структурам, чем кольцевые модели. Выявлены зависимости поляризованности и энергии НОМО-LUMO щели от напряженности электрического поля.

**Ключевые слова:** аминокислоты, дипептиды, пептидная нанотрубка, молекулярное моделирование, полуэмпирические методы.

Одной из актуальных тем современной биофизики и биотехнологии является создание искусственных структур на основе аминокислот. В настоящей работе мы исследуем структурные и физические свойства дипептидных нанотрубок на основе фенилаланина, лейцина, изолейцина различной хиральности при различных значениях электрического поля. На данный момент мы обладаем экспериментальными данными, описывающими структуру, только для нанотрубок на основе дифенилаланина и дилейцина. Структура диизолейциновых нанотрубок остается невыясненной. Тем не менее были предприняты попытки построить все вышеперечисленные модели, а также подробно изучить их физические свойства, для чего было использовано компьютерное моделирование.

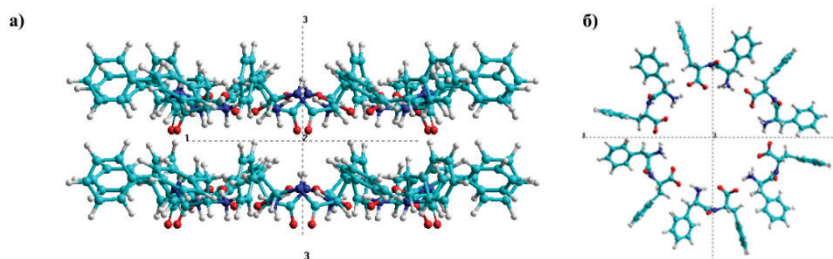
Важную роль в изучении кристаллографических структур дипептидов и дифенилаланиновых нанотрубок сыграли работы Карла Горбитца [1-3]. Было выяснено, что данные структуры могут быть использованы для распознавания  $\beta$ -амилоидов при болезни Альцгеймера из-за схожей кристаллографической структуры [4]. Актуальными для изучения являются пьезо-, сегнето- и фотоэлектрические свойства дипептидных нанотрубок, исследование которых необходимо для применения данных структур в широком диапазоне областей. В работах В.С. Быстрова с соавторами были рассмотрены результаты компьютерного моделирования нанотрубок из дифенилаланина различной хиральности, а также были построены и исследованы модели кластеров воды внутри них [5-10]. Было также показано, что фотоэлектронные свойства дифенилаланиновых нанотрубок могут применяться для обнаружения озоновых дыр [11]. Х.Р. Лейтчагом и В.С. Быстрым было высказано предположение о наличии полярных и пьезоэлектрических свойств у большинства аминокислот, особенно у аминокислот с разветвленной цепью (аналогичных ароматическим кольцам фенилаланина) [12,13].

В настоящей работе было изучено формирование наноструктур различной хиральности из дипептидов фенилаланина, изолейцина и лейцина, с применением методов компьютерного моделирования, а также исследованы их физические и структурные свойства. В том числе, рассчитаны дипольные и полярные свойства наноструктур на основе дифенилаланина, диизолейцина и дилейцина полуэмпирическими квантово-химическими методами AM1, PM3, RM1 в приближении Хартри-Фока с помощью программного обеспечения HyperChem [14], проведены расчеты энергетических электронных уровней и фотоэлектронных свойств для пептидных нанотрубок методами AM1, PM3, RM1.

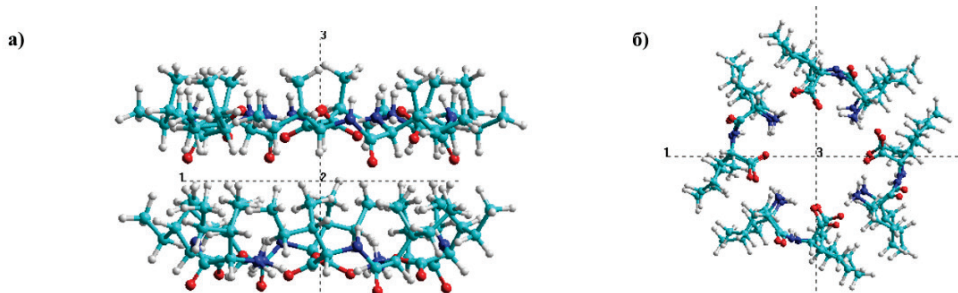
Для исследований были построены спиральные и кольцевые модели наноструктур на основе дифенилаланина, диизолейцина и дилейцина различной хиральности. Кольцевые модели строились исходя из теоретических представлений. Спиральные модели на основе дифенилаланина и левого дилейцина были взяты из базы данных CCDC [15], а остальные спиральные модели строились по аналогии с ними. Построения происходили в программном обеспечении HyperChem с использованием встроенной в него базы аминокислот. Также в HyperChem проводилась оптимизация методом Полака-Рибьера и Single Point молекул и расчет необходимых параметров.

Модели делятся на 2 группы, первые и более ранние – это кольцевые модели, они состояли из 2-х колец по 4 дипептида для лейцина и изолейцина и по 6 дипептидов в случае фенилаланина (представлены на рисунках 1 и 2). Физические параметры данных моделей изменяются в зависимости от хиральности и методов оптимизации. Для дилейциновых колец диаметр, измеряемый как расстояние от противоположных атомов азота





**Рисунок 1.** Дифенилаланиновые кольцевые нанотрубки L-конфигурации: а) продольный вид; б) поперечный вид



**Рисунок 2.** Диизолейциновые кольцевые нанотрубки L-конфигурации: а) продольный вид; б) поперечный вид

в центрах дипептидов, колеблется от 11,95 Å до 12,84 Å. Для колец из диизолейцина – от 12,18 Å до 12,58 Å, для колец из дифенилаланина – от 17,26 Å до 17,74 Å. Расстояние между слоями, измеряемое также между атомами азота, составило для колец из дилейцина – от 5,38 Å до 5,96 Å, для колец из диизолейцина – от 5,26 Å до 6,27 Å, для колец из дифенилаланина – от 4,99 Å до 5,98 Å. В случае спиральных моделей диаметр и расстояние между слоями измерялось аналогично. Диаметр для нанотрубок на основе дилейцина составляет от 9,05 Å до 10,98 Å, для нанотрубок из диизолейцина – от 12,73 Å до 13,66 Å, для нанотрубок из дифенилаланина – от 15,18 Å до 15,27 Å. Расстояние между слоями составило для нанотрубок из дилейцина – от 5,30 Å до 5,35 Å, для нанотрубок из диизолейцина – от 4,58 Å до 5,3 Å, для нанотрубок из дифенилаланина – от 5,44 Å до 5,46 Å.

Геометрическая оптимизация при построении проводилась полуэмпирическими квантово-химическими методами AM1, PM3, RM1 в приближении Хартри-Фока. Для всех вышеперечисленных моделей были рассчитаны значения энергии НОМО и LUMO орбиталей (EH и EL, eV), а также значения дипольного момента (D, Д) и объема Ван-дер-Вальса. Величины рассчитывались при разных значениях электрического поля от -0,01 до 0,01 (E, a.u.). Далее на основании этих результатов были вычислены значения энергии НОМО-LUMO щели (Eg, eV) и поляризованности (P, C/m<sup>2</sup>) с помощью формул:

$$P = 3,33556255 \frac{D}{V}, \quad (1)$$

$$E_g = E_L - E_H, \quad (2)$$

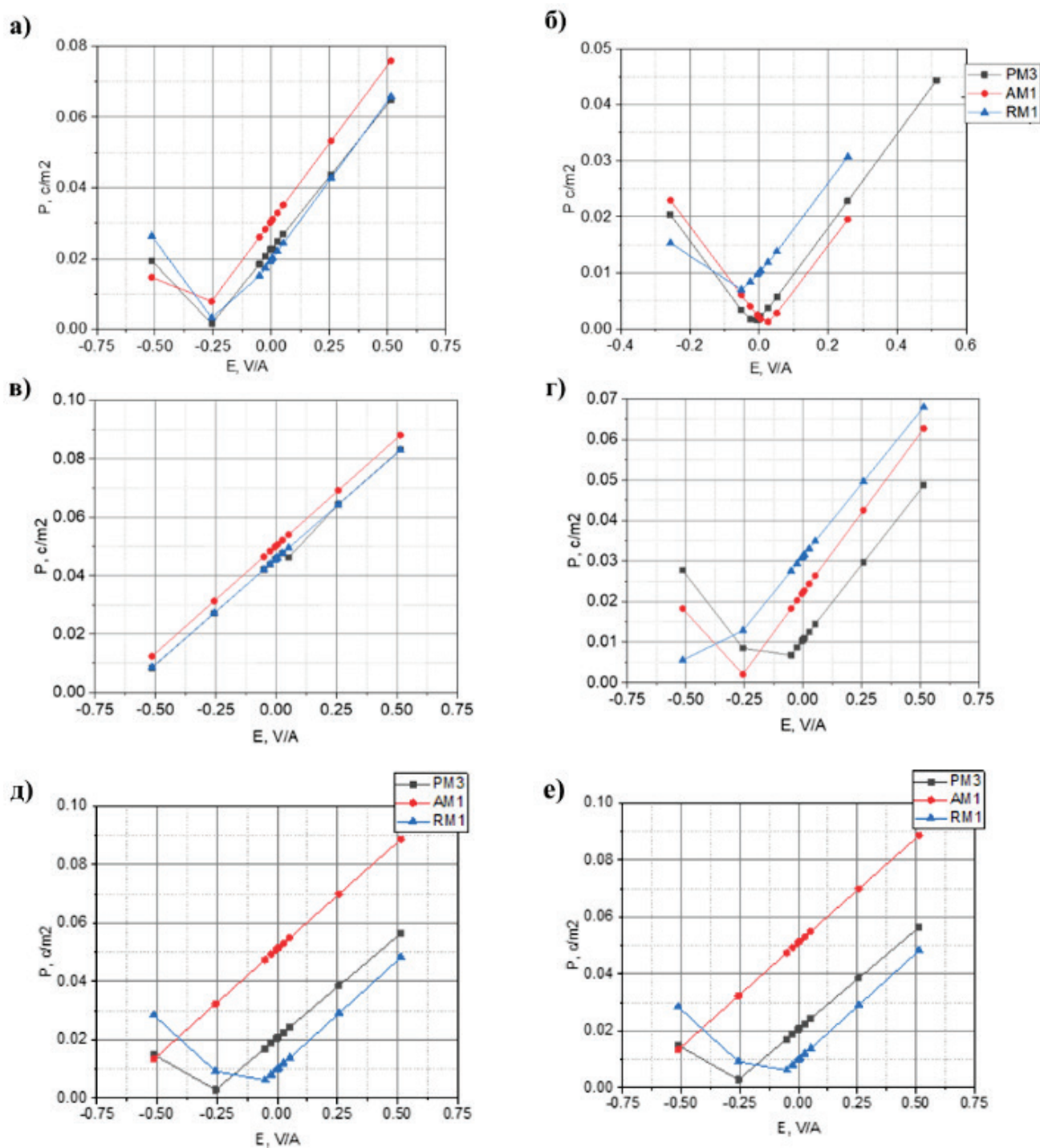
а значения величины электрического поля были переведены в единицы измерения V/Å по формуле:

$$[V/\text{Å}] = 51,4 * [\text{a. u.}]. \quad (3)$$

Результаты расчетов с помощью HyperChem представлены ниже на рисунках 3-6 в виде графиков зависимости поляризованности и энергии НОМО-LUMO щели от напряженности электрического поля.

Стоит отметить, что в ходе измерений при изменении значений электрического поля оптимизация проводилась с помощью метода Single Point, который не меняет конфигурацию, поэтому данные при слишком больших значениях электрического поля могут соответствовать не существующим в реальности нанотрубкам. Также спиральные модели сложнее поддавались геометрической оптимизации методом Полака-Рибьера, вследствие чего считалось, что нанотрубки из базы данных CCDC были уже заранее оптимизированы в естественной среде. Также стоит уточнить, что для дифенилаланиновых спиральных нанотрубок сложнее провести квантово-химические измерения из-за большого количества молекул и более сложной структуры, оптимизированной в естественной среде. Поэтому измерения проводились для более узкого интервала величин напряженности электрического поля, а также не всеми методами.

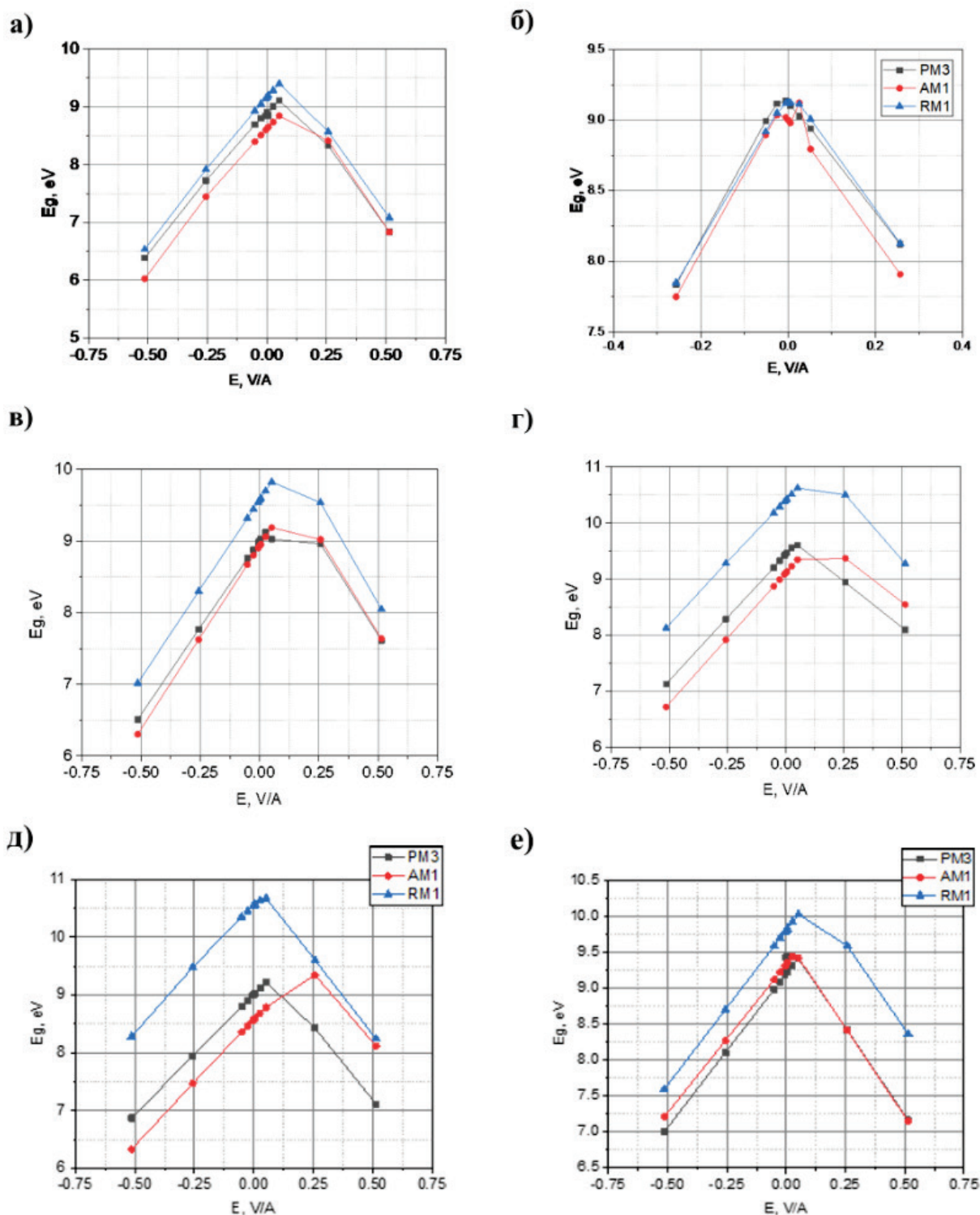
В ходе проведения работы нами показано, что спиральные нанотрубки наиболее точно отражают экспериментальные данные. Электронные и оптические свойства нанотрубок на основе изолейцина и лейцина соответствуют свойствам дифенилаланиновых нанотрубок. Отмечено, что нанотрубки на основе левых



**Рисунок 3.** Графики зависимости поляризованности ( $P$ ,  $C/m^2$ ) от электрического поля ( $E$ ,  $V/\text{Å}$ ). Кольцевые нанотрубки на основе: а) дифенилаланина L-конфигурации; б) дифенилаланина D-конфигурации; в) диизолейцина L-конфигурации; г) диизолейцина D-конфигурации; д) дилейцина L-конфигурации; е) дилейцина D-конфигурации

дипептидов являются правозакрученными, а на основе правых – левозакрученными, что еще раз подтверждает тенденцию чередования знака хиральности [16]. Рассчитанные величины поляризованности и ширины запрещенной зоны для спиральных нанотрубок на основе левых и правых дипептидов имеют одинаковый порядок.

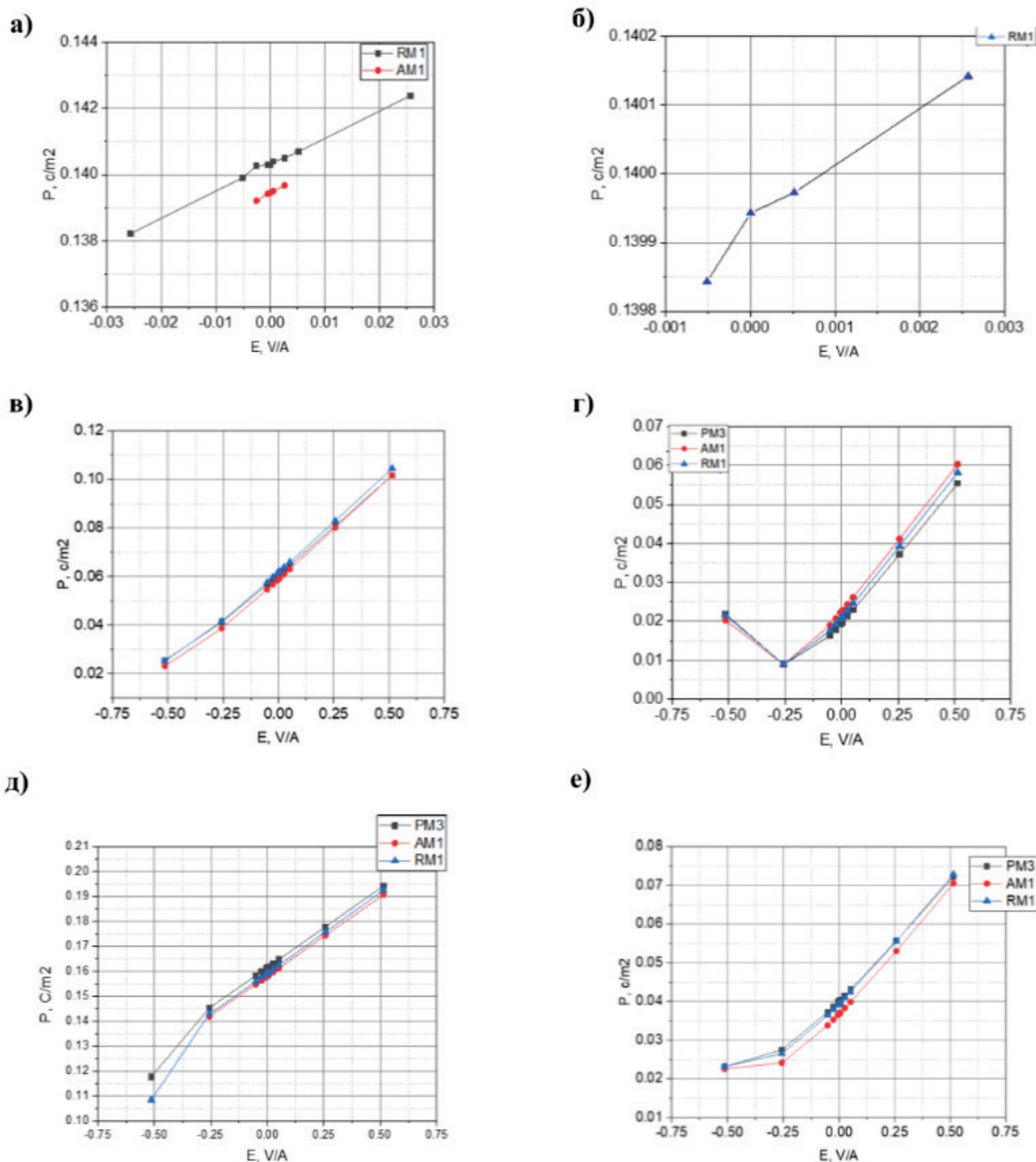
Для дальнейшего практического применения важны числовые значения результатов. Для спиральных структур, построенных на основе данных рентгеноструктурного анализа, значения поляризованности  $\approx 0,15 C/m^2$  в отсутствие электрического поля, что в три раза больше, чем для остальных структур ( $\approx 0,05 C/m^2$ ). Также были получены зависимости ширины запрещенной зоны от электрического поля. Показано, что для кольцевых моделей характерны наибольшие значения энергий HOMO-LUMO щели  $\approx 9$  эВ при нулевом значении



**Рисунок 4.** Графики зависимости ширины запрещенной зоны ( $E_g$ , eV) от электрического поля ( $E$ , V/Å). Кольцевые нанотрубки на основе: а) дифенилаланина L-конфигурации; б) дифенилаланина D-конфигурации; в) диизолейцина L-конфигурации; г) диизолейцина D-конфигурации; д) дилейцина L-конфигурации; е) дилейцина D-конфигурации

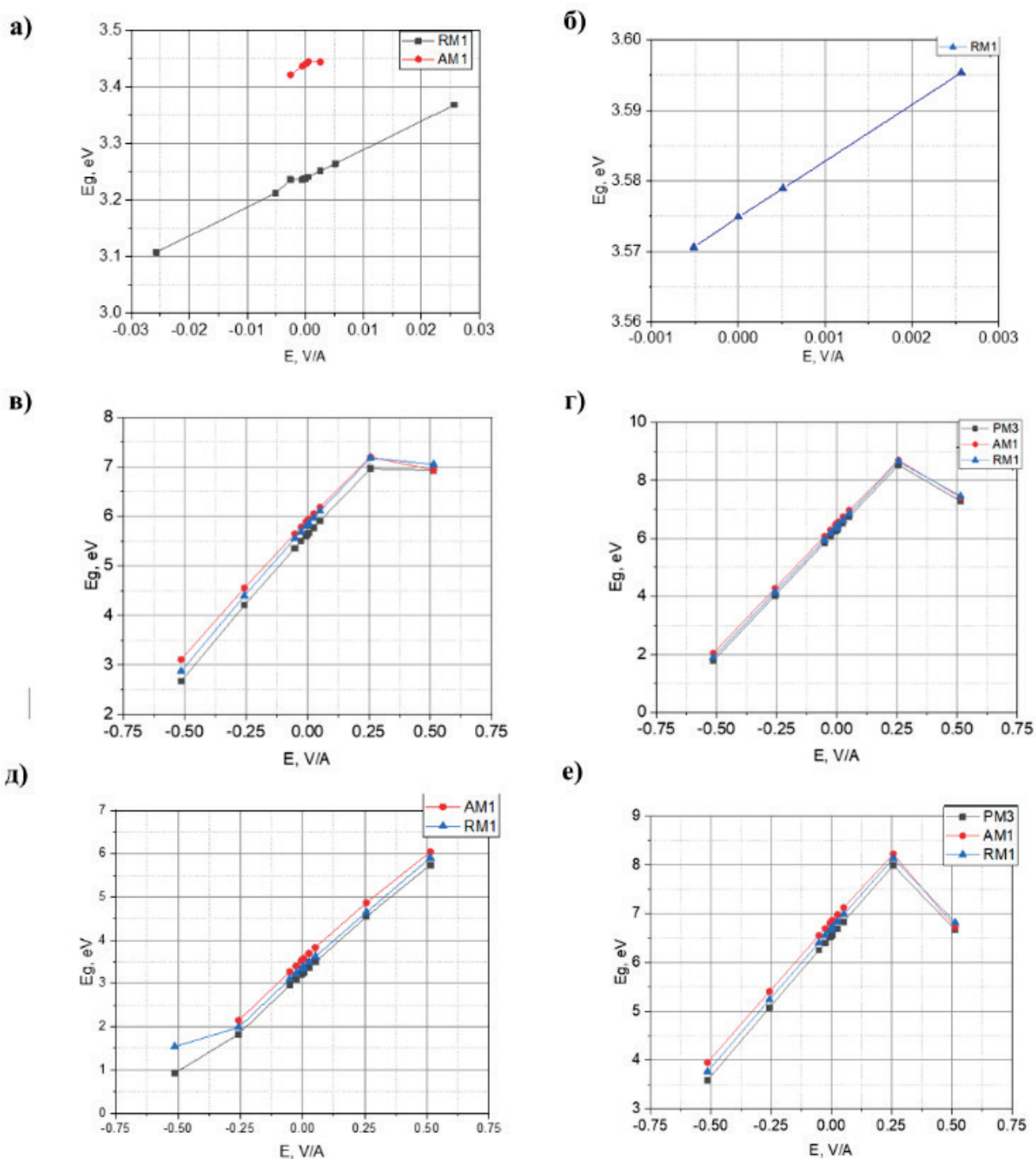
напряженности электрического поля. Энергия модельных нанотрубок, построенных на основе данных рентгеноструктурного анализа, лежит в пределах 3,5 эВ, а построенных нами по аналогии им – в пределах 6 эВ.

В данной работе не учитывалось влияние водных кластеров на дипольный момент и ширину запрещенной зоны, также все расчеты проводились в вакууме, а не в естественной среде. Для лучшего понимания результатов работы необходимо выполнить сравнение с экспериментальными данными. Анализ экспериментальных кристаллографических рентгеновских данных показал, что дипептиды образуют структуры, которые



**Рисунок 5.** Графики зависимости поляризованности ( $P$ , C/m<sup>2</sup>) от электрического поля ( $E$ , V/Å). Спиральные нанотрубки на основе: а) дифенилаланина L-конфигурации; б) дифенилаланина D-конфигурации; в) диизолейцина L-конфигурации; г) диизолейцина D-конфигурации; д) дилейцина L-конфигурации; е) дилейцина D-конфигурации

складываются не из плоских параллельных колец, а из витков спиралей. Впервые это было выяснено в работах Горбитца для нанотрубок на основе дипептидов L-конфигурации фенилаланина и лейцина. Также недавно были получены данные о спиральной структуре для нанотрубок на основе дифенилаланина D-конфигурации [17]. Все эти данные находятся в базе CCDC. В данный момент проводятся эксперименты по синтезу и исследованию нанотрубок на основе дилейцина D-конфигурации.



**Рисунок 6.** Графики зависимости ширины запрещенной зоны ( $E_g$ , eV) от электрического поля ( $E$ , V/Å). Спиральные нанотрубки на основе: а) дифенилаланина L-конфигурации; б) дифенилаланина D-конфигурации; в) диизолейцина L-конфигурации; г) диизолейцина D-конфигурации; д) дилейцина L-конфигурации; е) дилейцина D-конфигурации

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была предпринята попытка детально исследовать формирование наноструктур из дипептидов различной хиральности и их электрические и оптические свойства. В результате работы были получены новые данные о зависимости свойств дипептидных нанотрубок от величины электрического поля. Было выяснено, что созданные нами спиральные модели аналогичны существующим в природе структурам, в отличие от кольцевых моделей. Все нанотрубки, независимо от хиральности, имеют достаточно высокие

значения поляризованности и ширины запрещённой зоны. Следовательно, они обладают ярко выраженными оптическими и электрическими свойствами и могут быть применены в различных сферах биофизики и биоинженерии.

Учитывая близость результатов для нанотрубок на основе дифенилаланина с результатами на основе для дилейцина и диизолейцина, можно предположить, что их так же можно применять для обнаружения озоновых дыр. Показано, что для существующих в природе спиральных нанотрубок длина волны поглощенного света составляет примерно от 500 нм до 650 нм и лежит в области между пиками поглощения хлорофилла. Они могут быть использованы для доставки лекарств или в качестве разнообразных сенсоров, для создания молекулярных машин или для сборки конструкций из нанопроводников.

#### Список литературы / References:

1. Gorbitz C.H. Hydrophobic dipeptides: the final piece in the puzzle. *Acta Section B: Structural Science*, 2018, no. 74(3), pp. 311-318.
2. Gorbitz C.H. A crystallographic titration of the dipeptide L-isoleucyl-L-isoleucine. *Acta Crystallographica*, 2004, no. 60, pp. 569-577.
3. Gorbitz C.H. Nanotube Formation by Hydrophobic Dipeptides. *Chemistry - A European Journal*, 2002, no. 7(23), pp. 5153-5159.
4. Gorbitz C.H. The structure of nanotubes formed by diphenylalanine, the core recognition motif of Alzheimer's B-amyloid polypeptide. *Chemical Communications*, 2006, no. 22(22), pp. 2332-4.
5. Bystrov V.S., Paramonova E., Bdikin I., Kopyl S., Heredia A., Pullar R.C., Kholkin A.L. BioFerroelectricity: Diphenylalanine Peptide Nanotubes Computational Modeling and Ferroelectric Properties at the Nanoscale. *Ferroelectrics*, 2012, no. 440, pp. 3-24.
6. Bystrov V. Photoelectronic properties of diphenylalanine peptide nanotubes. *Computational Condensed Matter*, 2018, vol. 14, pp. 94-100, doi: 10.1016/j.cocom.2017.11.007.
7. Bystrov V.S., Filippov S.V. Molecular modelling and computational studies of peptide diphenylalanine nanotubes, containing waters: structural and interactions analysis. *Journal of Molecular Modeling*, 2022.
8. Bystrov V.S., Bdikin I.K., Budhendra Singh. Piezoelectric and ferroelectric properties of various amino acids and tubular dipeptide nanostructures: Molecular modelling. *Nanomaterials Science & Engineering*, 2020, no. 2(1), pp. 11-24.
9. Bystrov V., Coutinho J., Zelenovskiy P., Nuraeva A., Kopyl S., Zhulyabina O., Tverdislov V. Structures and properties of the self-assembling diphenylalanine peptide nanotubes containing water molecules: modeling and data analysis. *Nanomaterials*, 1999 (2020), no. 10(10).
10. Bystrov V.S., Zelenovskiy P.S., Nuraeva A.S., Kopyl S., Zhulyabina O.A., Tverdislov V.A. Molecular modeling and computational study of the chiral dependent structures and properties of self-assembling diphenylalanine peptide nanotubes. *Journal of Molecular Modeling*, 2019, no. 25, p. 199.
11. Быстров В.С. Парамонов Е.В. Зеленовский П.С. и др. Фотоэлектронные свойства дифенилаланиновых пептидных нанотрубок. Доклады Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». Под ред. В.Д. Лахно, Пушкино: ИМПБ РАН, 2022, т. 9, статья № е18, doi: 10.17537/icmbb22.24. [Bystrov V.S. Paramonov E.V. Zelenovsky P.S. et al. Photoelectronic properties of diphenylalanine peptide nanotubes. *Reports of the International Conference "Mathematical Biology and Bioinformatics"*. Edited by V.D.Lakhno, Pushchino: IMPB RAS, 2022, vol. 9, article no. e18 (In Russ.)].
12. Leuchtag H.R. Voltage-Sensitive Ion Channels: Biophysics of Molecular Excitability. *Dordrecht: Springer*, 2008, 529 p.
13. Leuchtag H.R., Bystrov V.S. Theoretical models of conformational transitions and ion conduction in voltage-dependent ion channels: Bioferroelectricity and superionic conduction. *Ferroelectrics*, 1999, vol. 220, no. 3-4, pp. 157-204.
14. Hyperchem release 7.01 Professional for Windows, (C). 1985-2007, Hypercube, Inc. All Rights Reserved [Электронный ресурс].
15. CCDC Home | CCDC [Electronic resource].
16. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. и др. Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. *Биофизика*, 2017, № 62(3), с. 421-434 [Tverdislov V.A., Malyshko E.V., Ilchenko S.A. and others. Periodic system of chiral structures in molecular biology. *Biophysics*, 2017, no. 62(3), pp. 421-434 (In Russ.)].
17. Zelenovskiy P., Slautina A., Kopyl S., Arkhipov S., Vasilev S., Bystrov V., Gruzdev D., Waliczek M., Svitlyk V., Shur V., Mafra L., Kholkin A. Chirality-Dependent Growth of Self-Assembled Diphenylalanine Microtubes. *Crystal Growth & Design*, 2019, no. 19(11), pp. 6414-6421.

## COMPUTER SIMULATION OF THE STRUCTURE AND PHYSICAL PROPERTIES OF PEPTIDE NANOTUBES

Ledeneva O.R.<sup>1</sup>, Belova E.V.<sup>1</sup>, Bystrov V.S.<sup>2</sup><sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University

Kolmogorova str. 1, Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup>Institute of Mathematical Problems of Biology, Keldysh Institute of Applied Mathematics of RAS

Prof. Vitkevich St. 1, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: olyaedenyova2002@gmail.com

Received 24.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0624

**Abstract.** The article presents calculations of dipole, polar and photoelectronic properties, as well as energy electronic levels of nanostructures based on diphenylalanine, diisoleucine and dileucine by AM1, PM3, RM1 methods of HyperChem software. The calculations performed in this article are necessary for the further use of peptide nanotubes for the detection of ozone holes, drug delivery or the creation of molecular machines. The work reveals that the electronic and optical properties of isoleucine and leucine-based nanotubes correspond to the properties of diphenylalanine nanotubes, which indicates the possibility of using dileucine and diisoleucine nanotubes on a par with diphenylalanine nanotubes. The spiral models created in the course of work are closer to real structures than ring models. We have identified the dependence of the polarization and energy of the HOMO-LUMO gap on the electric field strength.

**Key words:** amino acids, dipeptides, peptide nanotube, molecular modeling, semi-empirical methods.

## EXCITATIONS OF PYRONIN Y AND PYRONIN B DYES IN AQUEOUS SOLUTION: COMPARATIVE THEORETICAL ANALYSIS

Leontieva S.V.

Black Sea Higher Naval Orders of the Red Star School named after P.S. Nakhimov

Dybenko st., 1a, Sevastopol, 299028, Russia; e-mail: tezidi@gmail.com

Received 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0625

**Abstract.** To elucidate the effect of side groups on the excitation of xanthene dyes, pyronin Y (PY) and pyronin B (PB) were studied by DFT/TD-DFT. The calculation results were compared with each other, as well as with the data for the acridine red dye previously studied. The O3LYP/6-31++G(d,p)/IEFPCM theory level reproduced well the experimental spectra of PY and PB aqueous solutions. According to calculations, the short-wavelength shoulders of these spectra are caused by vibronic transitions. The side groups significantly affect the set of vibronic transitions. The photoexcitation significantly changes the intensities of IR vibrations. The side groups of these xanthene dyes (aminodimethyl/aminodiethyl) strongly influence the vibrations of their chromophores. HOMOs cover the side groups of both dyes to a greater extent compared to LUMOs. The configurations of both frontier orbitals around the chromophores are identical for PY and PB. The dipole moment of the dye molecules in the excited state turned out to be greater than in the ground state. In the ground state, the dipole moment of the PB is 2.5 times greater than that of the PY, and in the excited states, it is 1.7 times less. The transition moments of PY and PB are almost identical to each other. Considering site-specific solute-solvent interactions in the form of an explicit assignment of water molecules that form strong hydrogen bonds with the dye cations was performed.

**Key words:** TD-DFT, vibronic transitions, aqueous solution, pyronin Y, pyronin B, absorption spectrum.

### INTRODUCTION

Pyronin Y (PY, also known as pyronin G and pyronin J), and pyronin B (PB), are xanthene dyes [1]. PY is used for selective staining of RNA [2,3], as a fluorescent probe [4], as an optical sensor [5], and in solar cells [6,7]. PB is used for differential staining of nucleic acids only, in a mixture with methyl green [2]. One of the reasons for the limited use of PB compared to PY may be the bulkiness of the molecule of this dye, due to the presence of branched diethylamino groups (Fig. 1).

Using optical methods, it was found that, in addition to non-covalent binding to nucleic acids [2,3,8-10], PY and PB are also capable of forming non-covalent complexes with proteins [11], glucose [5], cyclodextrins [12], as well as with clay [13], nanoparticles [14,15] and nanocomposites [16]. Spectrophotometry has also been applied to study PY [10,12,17-24] and PB [12,18,24] aggregations and heteroassociation [25]. The optical properties of the dyes have also been studied experimentally in sufficient detail, both in films [26] and in various solvents [27-33]. However, a theoretical study of the electronically excited states of PY and PB was carried out only in three works [34-36]. Authors of these papers performed a systematic study of the vertical electronic transitions of these two xanthenes and large sets of rhodamine dyes using quantum chemistry methods (time-dependent density functional theory (TD-DFT) [34-36], algebraic-diagrammatic construction through second-order ADC(2), Extended Multi-Configuration Quasi-Degenerate Perturbation Theory (XMC-QDPT2) [35], and coupled-cluster CC2 [36]) with implicit water assignment [34,35] using the CPCM [37] model and in a gas phase [36]. It turned out that, in general, the TD-DFT and CC2 give the values of the transition energies overestimated in comparison with the experiment, and ADC(2) and XMC-QDPT2 – underestimated ones. In particular, for PY and PB, the best agreements with experiment ( $E_{\text{max}}=2.27$  eV and 2.24 eV, respectively, in aqueous solution) were achieved using TD-DFT/BP86/6-31+G(d,p)/CPCM ( $E_{\text{vert}}=2.42$  eV and 2.38 eV, respectively) and XMC-QDPT2 ( $E_{\text{vert}}=2.27$  eV and 2.16 eV, respectively) theory levels [35]. There is an excellent agreement between the theoretical result and the experiment in the latter case! In Ref. [34], at the B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM theory level, the

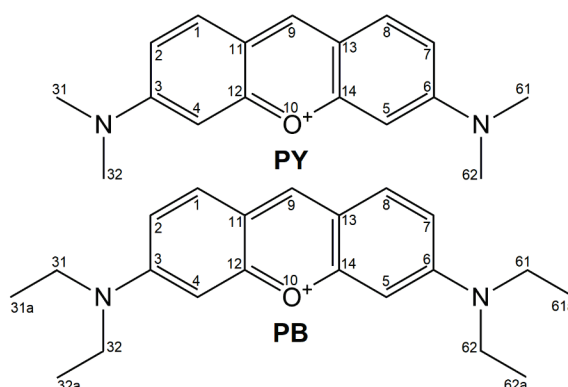


Figure 1. Chemical structures of PY and PB cations



$E_{\text{vert}}=2.64$  eV and 2.61 eV values were obtained for the PY and PB, respectively, in aqueous media. For PY in the gas phase [36],  $E_{\text{vert}}=2.98$  eV (TDDFT) and  $E_{\text{vert}}=2.58$  eV (CC2) values were obtained vs. the experimental  $E_{\text{max}}=2.40$  eV. However, the vertical transition model is quite simplified, although it is widespread in the literature (see review [38]). It does not consider the vibronic transitions, and therefore does not allow theoretically reproducing the asymmetric form of the experimental absorption and emission spectra of organic molecules. At the same time, the shape of the spectrum reflects the pattern of the excited states of the molecule and the transitions between them [39]. Thus, the absorption spectra of PY and PB both in an aqueous solution [2,10,23,24,33] and in non-aqueous solvents [2,28,31] contain a short-wavelength shoulders. Some authors [33] traditionally consider them to be dimeric. However, these shoulders are observed in the spectra of highly diluted ( $10^{-7}$  M) PY and PB solutions [15], in which the dimers contents, according to estimation from Ref. [32], are negligible. In addition, the short-wavelength shoulder is also contained in the spectrophotometrically resolved spectra of the PY and PB monomers [10,15,17,18]. The authors of Ref. [15] believe that the shoulders are of vibronic origin. Also, the shoulders can be due to separate electronic transitions. To answer this question, we calculated the vibronic absorption spectra of PY and PB in the visible region of the spectrum and analyzed their excited states and their interaction with the solvent. We also performed a comparative analysis of the excitations of these dyes to determine the effect of their side groups on them (see Fig. 1). Previously, a similar study [40] was performed by us for another xanthene dye, acridine red (AR), with side aminomethyl groups.

## METHODS

The initial spatial structures of the PY and PB cations were taken from the PubChem database (CIDs 7085 and 16524, respectively). These initial structures were then optimized at the O3LYP/6-31++G(d,p) theory level in both the ground and excited states. This theory level was chosen as optimal in our previous study of the related xanthene compound acridine red [40]. There were no imaginary frequencies in the IR spectra of these optimized structures, which indicated that the global minima of the PES had been reached (see Fig. 2) and made it possible to calculate the vibronic spectra.

The ground and excited states of the dyes were calculated using DFT and TD-DFT, respectively. In this case, the adiabatic Hessian and the harmonic approximation were used. Anharmonic effects should be small for rigid and semirigid molecules [41], such as the studied phenanthridines. Verification of the theory levels was carried out by comparing the calculated vibronic absorption spectra with the experimental ones, both in terms of the position of the maxima ( $\lambda_{\text{vibron}}$  vs.  $\lambda_{\text{max}}$ ) and shapes.

The vibronic absorption spectra of PY and PB in an aqueous solution were calculated using the time-independent DFT methodology [42] implemented in the Gaussian16 software package [43]. According to the Franck-Condon principle [44], the electronic transition occurs at fixed  $R_{\text{GS}}$  positions of the nuclei corresponding to the ground state, i.e. is vertical in Fig. 2 (yellow arrow). Correspondingly, the electric dipole moment also does not change during the transition. The application of the Franck-Condon principle to the analysis of absorption and emission of organic molecules is described in detail in Ref [41].

The nonequilibrium state of a molecule with an excited electron shell and a nuclear core that retains the same configuration as in the ground state will be denoted as Franck-Condon (FC) point. This non-equilibrium of the nuclear core with respect to electrons activates its vibrational energy levels (green wave in Fig. 2). Thus, the transition is not purely electronic, but vibronic. Therefore, in this work, in addition to the vibronic absorption spectra, we also analyzed the calculated IR spectra of both dye states. The probability of a vibronic transition depends on the sets of vibrational states of the ground and excited electronic states. Since the molecule under consideration is in solution, the polarization of the solvent closest to it is also nonequilibrium, and in this work, it is described using the state-specific polarizable continuum model [45]. Then the nuclei of the dissolved molecule are displaced, adjusting to the excited electron shell. The solvent also relaxes (its reaction field is described by the equilibrium solvation model [46]), and the "solute molecule+solvent" system passes (red arrow in

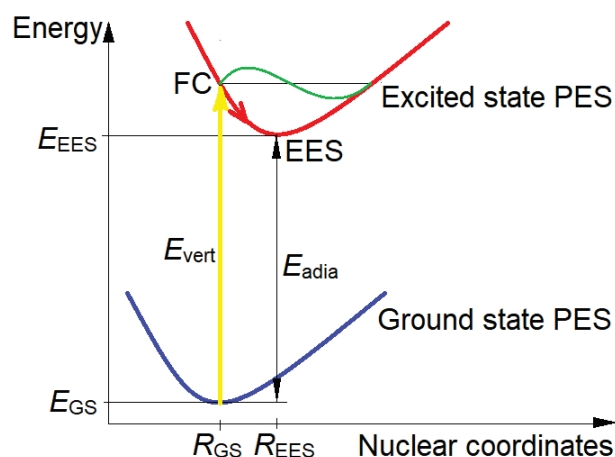


Figure 2. Simplified excitation diagram

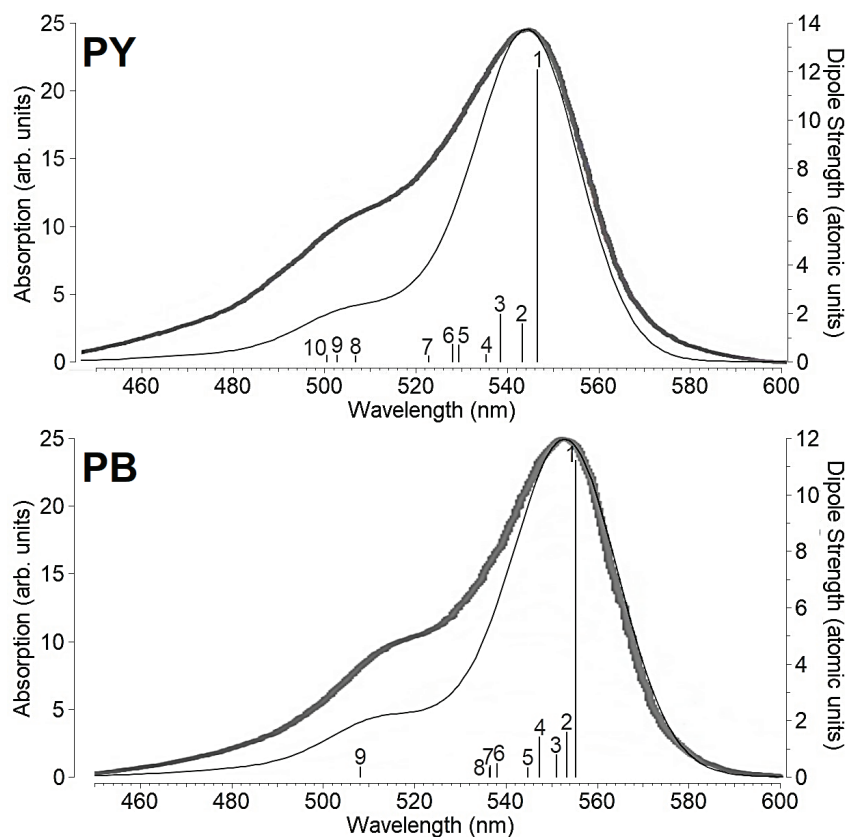
Fig. 2) into an excited equilibrium state (EES). The difference between the energies of the ground and excited equilibrium states is usually called the adiabatic energy,  $E_{\text{adia}}=E_{\text{EES}}-E_{\text{GS}}$  (see Fig. 2).

The broadening of the vibronic bands was carried out using Gaussians with half-width at half-maximum  $\text{HWHM}=600\text{ cm}^{-1}$ , and for IR peaks  $\text{HWHM}=4\text{ cm}^{-1}$  was used. The simulated temperature was assumed to be  $T=298\text{ K}$ . The electron density distribution was quantitatively described using NPA charges [47]. The calculated spectra, as well as the visualization of the calculated structures of dyes, MOs, distributions of electron densities, and electrostatic potentials, were performed using the Gaussview6.0 software package [48].

## RESULTS AND DISCUSSION

The vibronic absorption spectra obtained using the O3LYP/6-31++G(d,p)/IEPCM theory level are in excellent agreements with the experiments ( $\lambda_{\text{max}}=546\text{ nm}$ ,  $E_{\text{max}}=2.27\text{ eV}$  [8,15,16,27,30,33]) for PY and  $\lambda_{\text{max}}=552\dots554\text{ nm}$ ,  $E_{\text{max}}\approx 2.24\text{ eV}$  [15,25,27,33] for PB) on the positions of the main maxima ( $\lambda_{\text{vibron}}=545\text{ nm}$ ,  $E_{\text{vibron}}=2.28\text{ eV}$  for PY and  $\lambda_{\text{vibron}}=554\text{ nm}$ ,  $E_{\text{vibron}}=2.24\text{ eV}$  for PB). At the same time, the shoulders in the calculated spectra ( $\lambda_{\text{shoulder}}\approx 512\text{ nm}$  for PY and  $\approx 520$  for PB), although their positions are in good agreement with the experimental ones, are lower (Fig. 3). The shoulders of the experimental spectra are due to the sum of the contributions of vibronic transitions and dimer absorption. This feature also took place for AR [40]. How can you see the shoulders in the absorption spectra has a vibronic origin (see Fig. 3). These vibronic transitions involve compression-stretching vibrations of chromophore rings. The side groups significantly affect the set of vibronic transitions (see Table 1).

Comparing the calculated IR spectra of PY and PB in the ground and excited states (Figs. 4 and 5), one can see that photoexcitation significantly changes the intensities of vibrations. For PY, vibrations #54, #58 and #68 are amplified, and vibrations #60, #68 and #90 are weakened (see Fig. 4). For PB, vibrations #66 and #81 are amplified, and vibration #108 is weakened (see Fig. 4). All these vibrations are compression-stretching or shears of the chromophores. In this case, the photoinduced decrease in the frequencies of these vibrations is small ( $\Delta\nu\approx 50\text{ cm}^{-1}$ ). A comparison between the calculated IR spectra for PY and PB shows significant differences between them. Thus, the side groups of these xanthene dyes (aminodimethyl/aminodiethyl) strongly influence the vibrations of their chromophores. The calculated IR spectra of the ground and excited states of AR containing aminoethyl side groups [40] also differ essentially from the spectra of PY and PB.



**Figure 3.** The calculated vibronic absorption spectra of PY and PB in aqueous solution (thin lines) and the corresponding experimental spectra ( $10^{-7}\text{ M}$ ) from Ref. [15] (thick lines, permission from Elsevier, order 5115921255201). The vertical sticks are the dipole strength of the vibronic transitions from Table 1

**Table 1.** Calculated parameters of vibronic transitions during PY and PB photoexcitations in an aqueous solution

#	Transition	$\lambda$ (nm)	E (eV)	$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	I ( $\text{cm}^{-1}/$ ( $\text{molecule} \cdot \text{cm}^{-2}$ ))	p (atomic units)	Definition of vibrations
PY							
1	$0_0 \rightarrow 0^0$	548	2.26	0	181600	12.0	-
2	$0_0 \rightarrow 6^1$	544	2.28	107	23650	1.56	Flexural vibrations of a chromophore in its plane
3	$0_0 \rightarrow 15^1$	540	2.30	266	29880	1.95	Compression-stretching of the chromophore along its long axis
4	$0_0 \rightarrow 6^1 15^1$	537	2.31	107+266	4217	0.27	see above
5	$0_0 \rightarrow 28^1$	531	2.34	575	10540	0.68	Compression-stretching of the central ring of the chromophore along its short axis
6	$0_0 \rightarrow 32^1$	529	2.34	627	10950	0.70	
7	$0_0 \rightarrow 40^1$	524	2.36	811	3534	0.22	Shear vibrations of the side rings of the chromophore
8	$0_0 \rightarrow 71^1$	509	2.44	1397	3755	0.23	Compression-stretching of the side rings of the chromophore
9	$0_0 \rightarrow 90^1$	505	2.46	1552	4335	0.27	Shear vibrations of all chromophore rings
10	$0_0 \rightarrow 92^1$	503	2.47	1639	4076	0.25	Compression-stretching of all rings of the chromophore
PB							
1	$0_0 \rightarrow 0^0$	556	2.23	0	166400	11.2	-
2	$0_0 \rightarrow 5^1$	554	2.24	61.3	23560	1.58	Torsional vibration of diethylamino groups
3	$0_0 \rightarrow 11^1$	552	2.25	133	11670	0.780	Flexural vibration of a chromophore in its plane
4	$0_0 \rightarrow 19^1$	548	2.26	253	21210	1.41	Compression-stretching of the chromophore along its long axis
5	$0_0 \rightarrow 24^1$	546	2.27	334	4768	0.315	Pendulum vibrations of terminal methyl groups perpendicular to the plane of the chromophore
6	$0_0 \rightarrow 36^1$	539	2.30	559	7017	0.458	Compression-stretching of the central ring of the chromophore along its short axis
7	$0_0 \rightarrow 39^1$	538	2.31	613	6074	0.396	Shear vibrations of the side rings of the chromophore
8	$0_0 \rightarrow 40^1$	538	2.31	615	4660	0.304	
9	$0_0 \rightarrow 120^1$	510	2.43	1624	5675	0.351	Compression-stretching of the side rings of the chromophore along its long axis

$\lambda$  is the wavelength, E is the energy of the vibronic transition,  $\nu$  is the vibration frequency, I is the line intensity, and p is the dipole strength

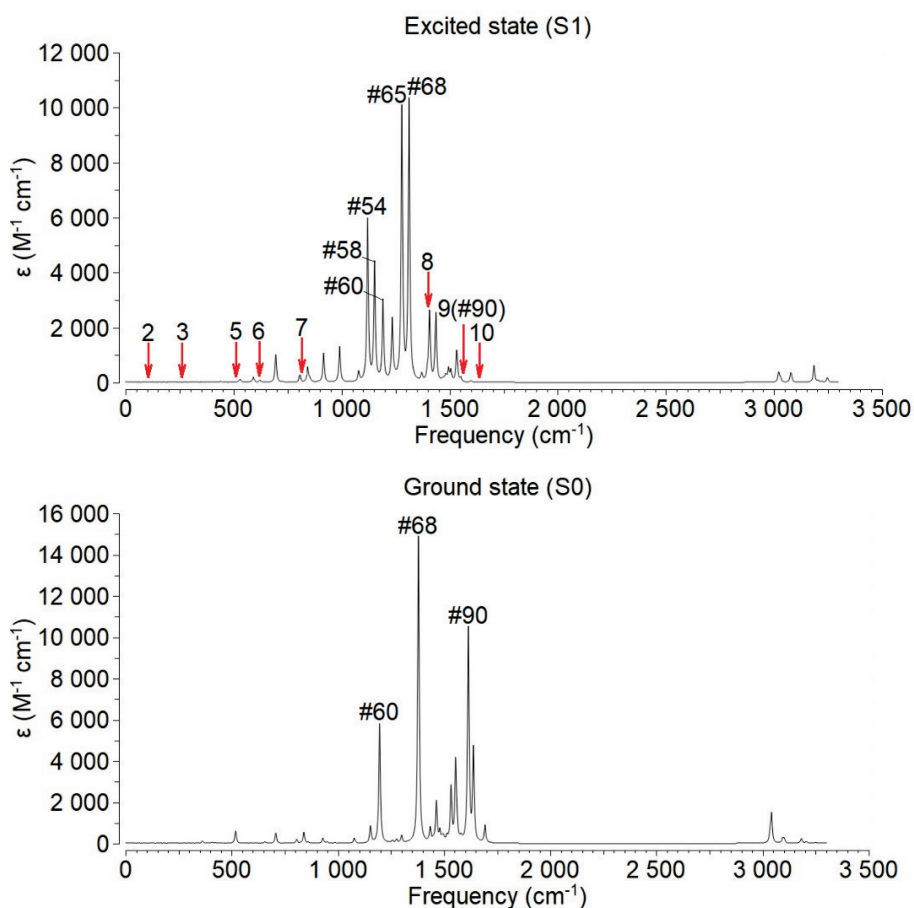


Figure 4. Calculated IR spectra of PY in aqueous solution. The peaks of the IR spectrum of the excited state, corresponding to the vibration frequencies involved in vibronic transitions (see Table 1), are shown by red arrows

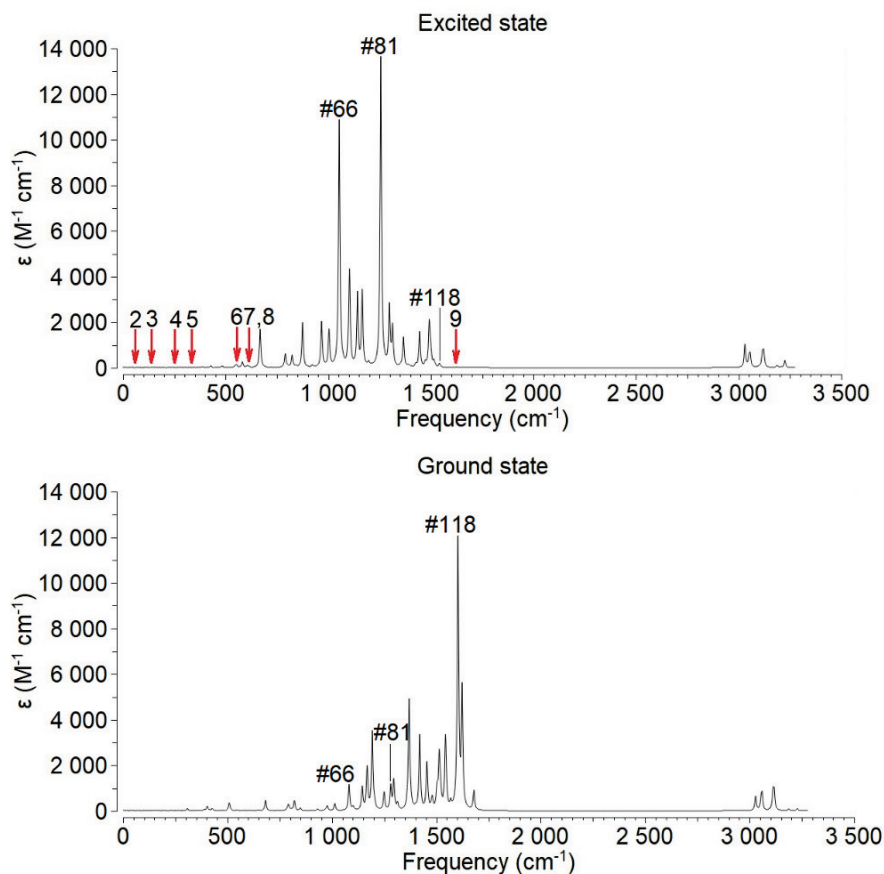


Figure 5. Calculated IR spectra of PB in an aqueous media

**Table 2.** Calculated parameters of ground and excited electronic states and transitions between them ( $C_1$  point group of symmetry) in the visible and near UV regions of spectrum for PY in an aqueous solution

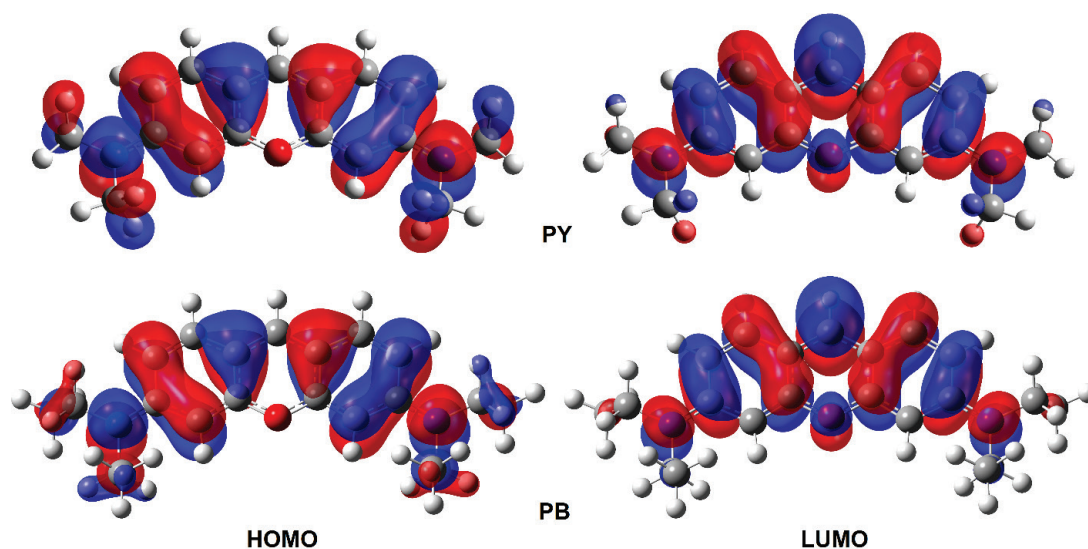
Electronic states	$E_{eq}^*$ (eV)	Electronic transition	$\lambda_{adia}$ (nm)	$E_{adia}$ (eV)	$\lambda_{vert}$ (nm)	$E_{vert}$ (eV)	$\lambda_{vibron}$ (nm)	$E_{vibron}$ (eV)	f	Involved transitions
PY										
$S_0$ (GS)	-22963.24	$S_0 \rightarrow S_1$	519	2.39	468	2.65	545	2.28	1.04	HOMO $\rightarrow$ LUMO
$S_1$ (ES <sub>1</sub> )	-22960.85									
$S_2$ (ES <sub>2</sub> )	-22960.31	$S_0 \rightarrow S_2$	423	2.93	394	3.14	446	2.78	0.0033	(HOMO-1) $\rightarrow$ LUMO
$S_3$ (ES <sub>3</sub> )	-22959.62	$S_0 \rightarrow S_3$	343	3.62	321	3.86	353	3.51	0.0439	(HOMO-2) $\rightarrow$ LUMO
PB										
$S_0$ (GS)	-27238.51	$S_0 \rightarrow S_1$	532	2.33	482	2.57	554	2.24	1.08	HOMO $\rightarrow$ LUMO
$S_1$ (ES <sub>1</sub> )	-27236.18									
$S_2$ (ES <sub>2</sub> )	-27235.67	$S_0 \rightarrow S_2$	437	2.84	407	3.05	452	2.74	0.0056	(HOMO-1) $\rightarrow$ LUMO
$S_3$ (ES <sub>3</sub> )	-27234.97	$S_0 \rightarrow S_3$	350	3.54	330	3.76	361	3.43	0.0388	(HOMO-2) $\rightarrow$ LUMO

\*equilibrium energy (PES minima, see Fig. 2)

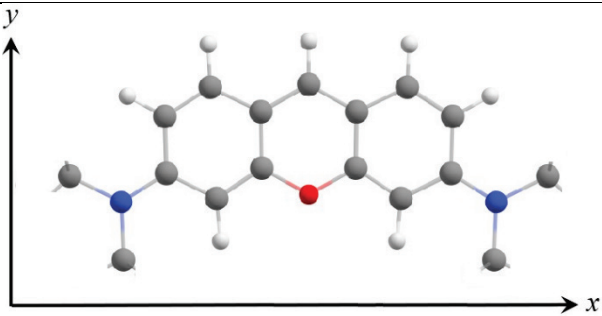
According to calculations, the two next electronic transitions ( $S_0 \rightarrow S_2$  and  $S_0 \rightarrow S_3$ ) of PY and PB in the visible and near UV regions have very low f oscillator strength values (Table 2), and therefore do not make a significant contribution to the absorption spectra. When calculating the vibronic spectra of the  $S_0 \rightarrow S_1$  transitions, the sums of the Franck-Condon factors were 99.94% for PY and 99.81 % for PB. Due to the larger number of atoms in PY compared to PB, the energies of its ground and excited states also turn out to be higher in absolute value. For AR, the modules of the corresponding quantities are even smaller [40].

The visualization of the frontier MOs involved in the  $S_0 \rightarrow S_1$  electronic transitions considered is shown in Fig. 6. It should be noted that in this work they are visualized for the first time. As can be seen, HOMOs cover the side groups of both dyes to a greater extent compared to LUMOs. At the same time, the configurations of both frontier orbitals around the chromophores are identical for PY and PB. HOMOs do not include O10 heterocyclic oxygen atoms as well as most hydrogen atoms.

According to calculations, the dipole moments  $\mu$  of the dye molecules increase upon photoexcitation:  $\mu_{GS} < \mu_{FC} < \mu_{ES}$  (Table 3). This pattern corresponds to the  $\pi \rightarrow \pi^*$  type of electronic transition and positive solvatochromism [57]. It is interesting to note that in the ground state the  $\mu$  of the PB is 2.5 times greater than that of the PY, and in the excited states it is 1.7 times less. Due to the axial symmetry of the molecules of both dyes, the  $\mu$  of their ground and excited states are directed across the chromophore - from the C9 atom to the O10 atom. An explanation of the photoinduced increase in  $\mu$  based on the analysis of atomic charges will be given below. The transition moments M are directed along the dye chromophores and are almost identical to each other. The values of  $\mu$  and M for PY and PB are calculated for the first time in this work: oddly enough, for these classical dyes, these data are not available in the literature. Note that for the AR, the corresponding calculated values were  $\mu_{GS}=0.955$  D,  $\mu_{FC}=2.80$  D,  $\mu_{ES}=2.79$  D, and  $M=11.9$  D [40].

**Figure 6.** Frontier MOs, the transitions between which correspond to the main absorption peaks in the visible region. Positive lobes are shown in red and negative lobes in blue. Isovalue is  $0.02 e/(a.u.^3)$  and isodensity cutoff is  $0.0004 e/(a.u.^3)$

**Table 3.** Calculated moments of PY and PB cations in an aqueous solution

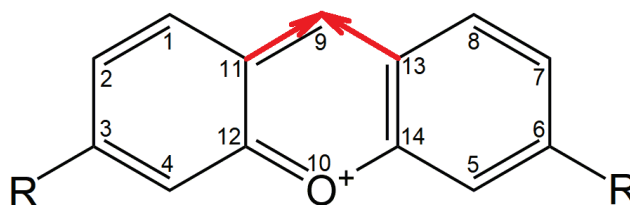


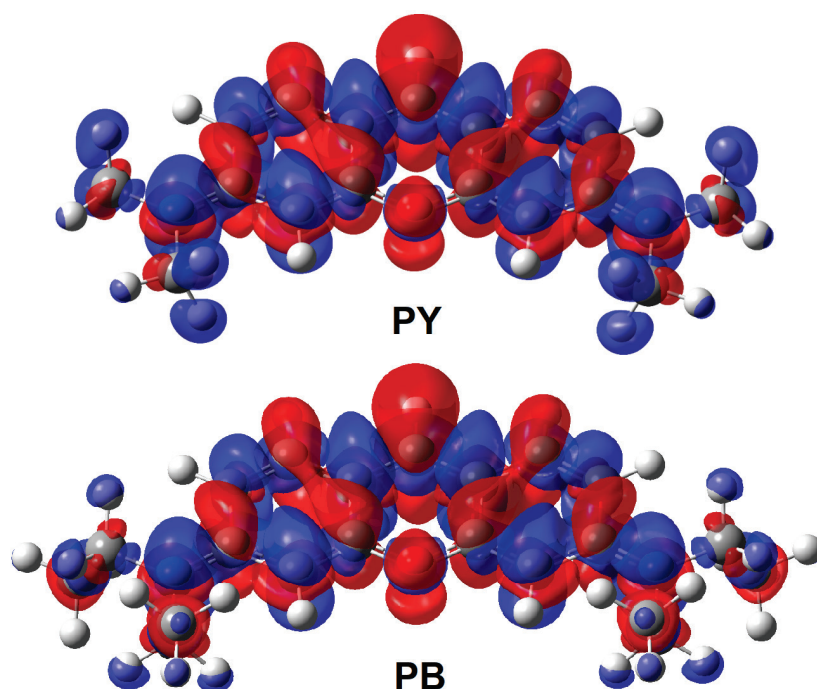
The coordinate axes are directed along the principal axes of inertia of the molecules

Dipole moment (D)	Ground state ( $S_0$ )	Excited state ( $S_1$ )		Ground to excited state transition dipole moment (D)	
		Franck-Condon (FC)	Equilibrium (ES)		
PY					
$\mu_x$	-0.0077	-0.0082	-0.0102	$M_x$	12.0
$\mu_y$	-0.290	-2.45	-2.40	$M_y$	0.0000
$\mu_z$	0.0039	0.0040	0.0029	$M_z$	-0.0013
$\mu$	0.290	2.45	2.40	M	12.0
PB					
$\mu_x$	0.0048	0.0020	-0.0008	$M_x$	12.3
$\mu_y$	0.707	-1.45	-1.37	$M_y$	0.0000
$\mu_z$	-0.162	0.245	0.245	$M_z$	0.0000
$\mu$	0.725	1.47	1.39	M	12.3

However, PY and PB do not show pronounced solvatochromism: their absorption maxima are respectively  $\lambda_{\max}=543$  nm and 554 nm in dioxane ( $E_T^N=0.164$ , normalized empirical microscopic solvent polarity parameter [49]), 549 nm and 555 nm in tetrahydrofuran ( $E_T^N=0.207$ ), 547 nm, and 553 nm in acetonitrile ( $E_T^N=0.460$ ), 552 nm and 557 nm in dimethylformamide ( $E_T^N=0.386$ ), 547 nm and 553 nm in ethanol ( $E_T^N=0.654$ ), and 546 nm and 552 nm in water ( $E_T^N=1.000$ ) [28]. Therefore, it can be expected that, in addition to dipole-dipole interactions with the solvent, site-specific interactions (hydrogen bonds) make a significant contribution. The latter will be discussed below.

To understand the photoinduced charge redistribution in the PY and PB molecules, we analyzed the NPA charges of heavy (non-hydrogen) atoms in the ground and excited states. The charges of the atoms of the chromophores of both dyes are close to each other, and the charges of the corresponding atoms of the side groups differ greatly, apparently due to their different structure. The GS $\rightarrow$ FC vertical transitions lead to a significant increase in electron density at the C9 atom and a decrease at C11 and C13 atoms (Fig. 7). The same picture took place earlier for AR [40]. For PY, this charge shift is larger compared to PB (see Fig. C4), which partly explains its higher absorption energy ( $E_{\max}=2.27$  eV for PY vs. 2.24 eV for PB, see above). Therefore, the  $\mu_y$  increases in absolute value, and, in general, the  $\mu$  increases (see Table 3). The FC $\rightarrow$ EES relaxations lead to weak changes in the atomic charges. In turn, this causes a slight decrease of  $\mu_y$  modulus and an insignificant decrease in the  $\mu$  of both cations. Visualizations of the differences in electron densities are shown in Fig. 8. It can be seen from them that the least involved in the photoinduced redistributions of electron densities are the hydrogen atoms of the methyl groups, as well as H2, H4, H5, and H7 atoms of the chromophore.

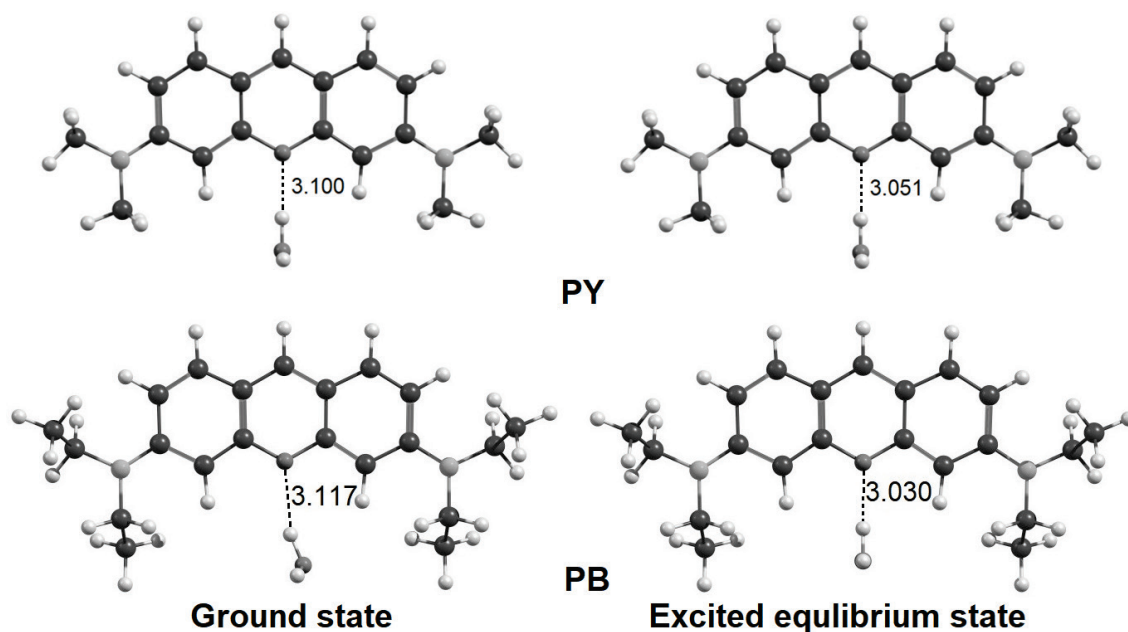

**Figure 7.** The main photoinduced shift of electron density in the chromophore of PY and PB



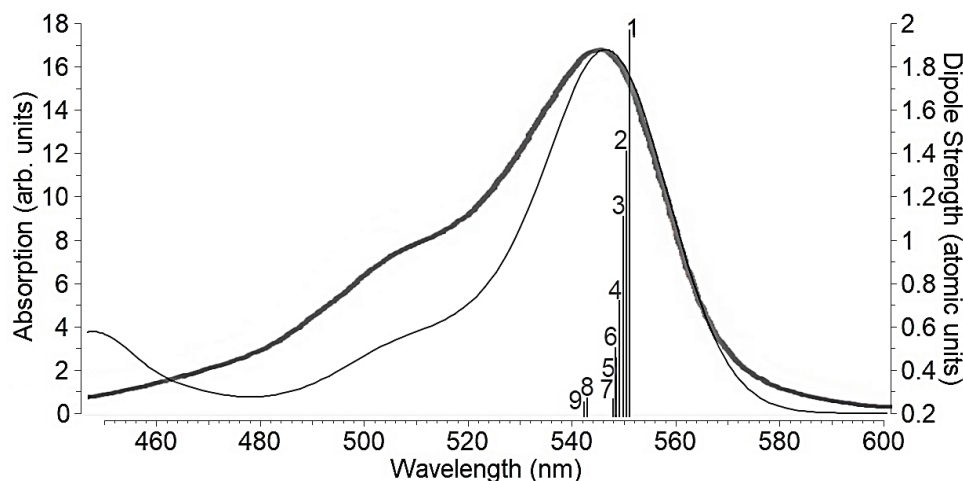
**Figure 8.** The electron density difference between Franck-Condon and ground states of PY and PB cations. Regions of positive values are shown in red and negative values in blue

Strong H-bonds between solute and solvent are site-specific interactions that are considered in the solvent continuum model used here averaged only. To estimate the effect of these H-bonds on the photoexcitation of the PY and PB molecules, an attempt was made to calculate the vibronic absorption spectra for the "PY+H<sub>2</sub>O" and "PB+H<sub>2</sub>O" hydrated complexes (Fig. 9).

According to calculations, the hydrogen bonds of PY and PB with water molecules in the excited state are stronger than in the ground state, which is manifested in their shortening (see Fig. 9). The phenomenon of enhanced hydrogen bonds with a solvent upon photoexcitation of various organic molecules was first discovered [50] and studied in detail [51] by Zhao and Han. The vibronic absorption spectrum of the "PY+H<sub>2</sub>O" compared with a single PY cation has an artifact short-wavelength maximum at  $\lambda_{\text{vibron}2}=448$  nm which is not observed in the experiment, and its absorption maximum is at  $\lambda_{\text{vibron}}=548$  nm, i.e. the spectrum is redshifted by  $\approx 3$  nm. The absorption intensity decreases slightly (cf. Figs. 4 and 10). The number of vibronic transitions has reduced from 10 to 9, and the transitions themselves have changed significantly (cf. Figs. 4 and 10, Table 1).



**Figure 9.** Calculated structures of the PY and PB hydration complexes with water molecules. Strong hydrogen bonds with their lengths in Å are shown with dotted lines



**Figure 10.** The calculated vibronic absorption spectrum of the "PY+H<sub>2</sub>O" system (thin line) and the experimental spectrum (10<sup>-7</sup> M PY in water) from Ref. [15] (thick line)

For the "PB+H<sub>2</sub>O" system, in the ground state, the bound water molecule is in the plane of the chromophore, while in the EES due to steric hindrances from the hydrogen atoms H4 and H5, it shifts, leaving it closer to us (see Fig. 9). The difference in the structures of the hydrating complex in the GS and EES turned out to be so significant that this led to a failure in the procedure of vibronic spectrum calculation.

For both dyes, the addition of strongly bound water molecules has little effect on their IR spectra (cf. Fig. 4 and 5). Visually, these differences are manifested in the fact that the most high-frequency (~4000 cm<sup>-1</sup>) vibrations of hydrogen atoms of water molecules are added. The configurations of the frontier orbitals of the "PY+H<sub>2</sub>O" and "PB+H<sub>2</sub>O" complexes (cf. Fig. 6), electron density differences (cf. Fig. 8), and electrostatic potential distributions practically coincide with those for a single cations.

## CONCLUSIONS

The O3LYP/6-31++G(d,p)/IEFPCM theory level reproduced the experimental spectra of PY and PB aqueous solutions quite accurately. According to calculations, the short-wavelength shoulders of these spectra are caused by vibronic transitions. The side groups significantly affect the set of vibronic transitions. The photoexcitation significantly changes the intensities of IR vibrations. The photoinduced decrease in the frequencies of these vibrations is small (~50 cm<sup>-1</sup>). The side groups of these xanthene dyes (aminodimethyl/aminodiethyl) strongly influence the vibrations of their chromophores. HOMOs cover the side groups of both dyes to a greater extent compared to LUMOs. At the same time, the configurations of both frontier orbitals around the chromophores are identical for PY and PB. The dipole moment of the dye molecules in the excited state turned out to be greater than in the ground state. In the ground state, the dipole moment of the PB is 2.5 times greater than that of the PY, and in the excited states, it is 1.7 times less. The transition moments of PY and PB are directed along the dye chromophores and are almost identical to each other. The excitations lead to a significant increase in electron densities at the C9 atoms and a decrease at C11 and C13 atoms. For PY, this charge shift is larger compared to PB which partly explains its higher absorption energy. Considering site-specific solute-solvent interactions in the form of an explicit assignment of water molecules that form strong hydrogen bonds with the dye cations led to a redshift of the entire spectrum by ≈3 nm for PY and fail of spectrum calculation for PB. For the "PB+H<sub>2</sub>O" system a short-wavelength peak appeared, which was not observed in the experiment.

### References:

1. Wright P. Xanthene Dyes in Kirk-Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2000.
2. Kurnick N.B. Methyl green-pyronin; basis of selective staining of nucleic acids. *J. Gen. Physiol.*, 1950, vol. 33, pp. 243-264.
3. Darzynkiewicz Z., Kapuscinski J., Traganos F., Crissman H.A. Application of Pyronin Y(G) in Cytochemistry of Nucleic Acids. *Cytometry*, 1987, vol. 8, pp. 138-145.
4. Tomov T.C. Pyronin G as a fluorescent probe for quantitative determination of the membrane potential of mitochondria. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1986, vol.13, pp. 29-38.
5. Essawy A.A., Attia M.S. Novel application of pyronin Y fluorophore as high sensitive optical sensor of glucose in human serum. *Talanta*, 2013, vol. 107, p. 18-24.
6. Balraju P., Janu Y., Roy M.S., Sharma G.D. Dye Sensitized Solar Cell Based On Pyronin G Dye and TiO<sub>2</sub>. *AIP Conf. Proc.*, 2008, vol. 1004, pp. 135-140.
7. Balraju P., Suresh P., Kumar M., Roy M.S., Sharma G.D. Effect of counter electrode, thickness and sintering temperature of TiO<sub>2</sub> electrode and TBP addition in electrolyte on photovoltaic performance of dye sensitized solar cell using pyronine G (PYR) dye. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2009, vol. 206, pp. 53-63.



8. Muller W., Crothers D.M. Interactions of Heteroaromatic Compounds with Nucleic Acids. 1. The Influence of Heteroatoms and Polarizability on the Base Specificity of Intercalating Ligands. *Eur. J. Biochem.*, 1975, vol. 54, pp. 267-277.
9. Kapuscinski J. Interactions of Nucleic Acids with Fluorescent Dyes: Spectral Properties of Condensed Complexes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1990, vol. 38, pp. 1323-1329.
10. Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. Interactions of Pyronin Y(G) With Nucleic Acids. *Cytometry*, 1987, vol. 8, pp. 129-137.
11. Salci A., Toprak M. Spectroscopic investigations on the binding of Pyronin Y to human serum albumin. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2017, vol. 35, pp. 8-16.
12. Bordello J., Reija B., Al-Soufi W., Novo M. Host-Assisted Guest Self-Assembly: Enhancement of the Dimerization of Pyronines Y and B by  $\gamma$ -Cyclodextrin. *ChemPhysChem*, 2009, vol. 10, pp. 931-939.
13. Grauer Z., Grauer G.L., Avnir D., Yariv S. Metachromasy in Clay Minerals. Sorption of Pyronin Y by Montmorillonite and Laponite. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1987, vol. 83, pp. 1685-1701.
14. Senol A.M., Metin O., Acar M., Onganer Y., Meral K. The interaction of fluorescent Pyronin Y molecules with monodisperse silver nanoparticles in chloroform. *J. Mol. Structure*, 2016, vol. 1103, pp. 212-216.
15. Arik M., Onganer Y. Molecular excitons of Pyronin B and Pyronin Y in colloidal silica suspension. *Chem. Phys. Lett.*, 2003, vol. 375, pp. 126-133.
16. Senol A.M., Metin O., Onganer Y. A facile route for the preparation of silver nanoparticles-graphene oxide nanocomposites and their interactions with pyronin Y dye molecules. *Dyes Pigments*, 2019, vol. 162, pp. 926-933.
17. Gianneschi L.P., Kurucsev T. Derivation and Interpretation of the Spectra of Aggregates. Part 3.-Prediction Analytical Study of the Spectrum of Pyronine Y in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc.*, 1974, vol. 70, pp. 1334-1342.
18. Gianneschi L.P., Cant A., Kurucsev T. Derivation and interpretation of the spectra of aggregates. *J. Chem. Soc.*, 1977, vol. 73, pp. 664-668.
19. Lee B.G., Kim K.J. Spectroscopic Characterization on the Aggregation Behavior of Pyronin G with Tetraphenylborate anion. *Anal. Sci. Technol.*, 1995, vol. 8, pp. 47-53.
20. Epelde-Elezcano N., Martinez-Martinez V., Duque-Redondo E., Temino I., Manzano H., López-Arbeloa I. Strategies for modulating the luminescence properties of pyronin Y dye-clay films: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, vol. 18, pp. 8730-8738.
21. Meral K., Yilmaz N., Kaya M., Tabak A., Onganer Y. The molecular aggregation of pyronin Y in natural bentonite clay suspension. *J. Luminesc.*, 2011, vol. 131, pp. 2121-2127.
22. Sinoforoglu M., Gur B., Arik M., Onganer Y., Meral K. Graphene oxide sheets as a template for dye assembly: graphene oxide sheets induce H-aggregates of pyronin (Y) dye. *RSC Adv.*, 2013, vol.3, pp. 11832-11838.
23. Fujiki K.O.N., Iwanaga C., Koizumi M. Some spectral studies of the aqueous solution of pyronine G. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1962, vol. 35, pp. 185-193.
24. Arik M., Meral K., Onganer Y. Effect of surfactants on the aggregation of pyronin B and pyronin Y in aqueous solution. *J. Luminesc.*, 2009, vol.129, pp. 599-604.
25. Arik M., Kassa S.B., Onganer Y. Molecular aggregates of pyronin dyes with polyelectrolyte polystyrene sulfonate (PSS) in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2020, vol. 391, p. 112309.
26. Meral K., Erbil H.Y., Onganer Y. A spectroscopic study of water-soluble pyronin B and pyronin Y in Langmuir-Blodgett films mixed with stearic acid. *Appl. Surf. Sci.*, 2011, vol. 258, pp. 1605-1612.
27. Zhang X.-F., Zhang J., Lu X. The Fluorescence Properties of Three Rhodamine Dye Analogues: Acridine Red, Pyronin Y and Pyronin B. *J. Fluoresc.*, 2015, vol. 25, pp. 1151-1158.
28. Baraka M.E., Deumie M., Viallet P., Lampidis T.J. Fluorimetric studies of solutions of pyronin dyes: equilibrium constants in water and partition coefficients in organic-solvent-water systems. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1991, vol. 56, pp. 295-311.
29. Celebi N., Arik M., Onganer Y. Analysis of fluorescence quenching of pyronin B and pyronin Y by molecular oxygen in aqueous solution. *J. Luminesc.*, 2007, vol. 126, pp. 103-108.
30. Rowe P.B. Spectrophotometry of dyes 1. Methyl green. 2. Pyronin. *Stain Tech.*, 1953, vol. 28, pp. 265-273.
31. Beser B.M., Onganer Y., Arik M. Photophysics and photodynamics of Pyronin Y in n-alcohols. *J. Luminesc.*, 2018, vol. 33, pp. 1394-1400.
32. Jakobsen P., Lyon H., Treppendahl S. Spectrophotometric characteristics and assay of pure pyronin Y. *Histochemistry*, 1984, vol. 81, pp. 99-101.
33. Gur B., Meral K. The effect of poly (vinyl alcohol) on the photophysical properties of pyronin dyes in aqueous solution: A spectroscopic study. *Spectrochim. Acta A*, 2013 vol. 101, pp. 306-313.
34. Savarese M., Aliberti A., De Santo I., Battista E., Causa F., Netti P.A., Rega N. Fluorescence Lifetimes and Quantum Yields of Rhodamine Derivatives: New Insights from Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. A*, 2012, vol. 116, pp. 7491-7497.
35. Zhou P. Why the lowest electronic excitations of rhodamines are overestimated by time-dependent density functional theory. *Int. J. Quantum Chem*, 2018, p. 25780.
36. Kulesza A.J., Titov E., Daly S., Wlodarczyk R., Megow J., Saalfrank P., Choi C.M., MacAleese L., Antoine R., Dugourd P. Excited States of Xanthene Analogues: Photofragmentation and Calculations by CC2 and Time-Dependent Density Functional Theory. *ChemPhysChem*, 2016, vol. 17, pp. 3129-3138.

37. Cossi M., Rega N., Scalmani G., Barone V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.*, 2003, vol. 24, pp. 669-681.
38. Adamo C., Jacquemin D. The calculations of excited-state properties with Time-Dependent Density Functional Theory. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, vol. 42, pp. 845-856.
39. Charaf-Eddin A., Planchat A., Mennucci B., Adamo C., Jacquemin D. Choosing a Functional for Computing Absorption and Fluorescence Band Shapes with TD-DFT. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9 pp. 2749-2760.
40. Kostjukov V.V. Vibronic absorption spectra and excited states of acridine red dye in aqueous solution: TD-DFT/DFT study. *Z. fur Natur. A*, 2022, vol. 77, pp. 207-215.
41. Alia J.D., Flack J.A. Unspecified verticality of Franck-Condon transitions, absorption and emission spectra of cyanine dyes, and a classically inspired approximation. *RSC Adv.*, 2020, vol. 10, pp. 43153-43167.
42. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.*, 2005, vol. 105, pp. 2999-3093.
43. Baiardi A., Bloino J., Barone V. General Time Dependent Approach to Vibronic Spectroscopy Including Franck-Condon, Herzberg-Teller, and Duschinsky Effects. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9, pp. 4097-4115.
44. Frisch M.J. et al. Gaussian 16, Revision C.01, Inc., Wallingford CT, 2016.
45. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872.
46. Scalmani G., Frisch M.J., Mennucci B., Tomasi J., Cammi R., Barone V. Geometries and properties of excited states in the gas phase and in solution: Theory and application of a time-dependent density functional theory polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.*, 2006, vol. 124, p. 94107.
47. Reed A.E., Curtiss L.A., Weinhold F. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem. Rev.*, 1988, vol. 88, pp. 899-926.
48. Dennington R., Keith T.A., Millam J.M. GaussView, Version 6.1, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2016.
49. Reichardt C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.*, 1994, vol. 94, pp. 2319-2358.
50. Zhao G.-J., Han K.L. Effects of hydrogen bonding on tuning photochemistry: Concerted hydrogen-bond strengthening and weakening. *ChemPhysChem*, 2008, vol. 9, pp. 1842-1846.
51. Zhao G.-J., Han K.-L. Hydrogen Bonding in the Electronic Excited State. *Acc. Chem. Res.*, 2012, vol. 45, pp. 404-413.

## ВОЗБУЖДЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ ПИРОНИНА У И ПИРОНИНА В В ВОДНОМ РАСТВОРЕ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Леонтьева С.В.

Черноморское высшее военно-морское Ордена Красной Звезды училище имени П.С. Нахимова

ул. Дыбенко 1а, г. Севастополь, 299028, РФ; e-mail: tezidi@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0625

**Аннотация.** Чтобы выяснить влияние боковых групп на возбуждение ксантеновых красителей, пиронин У (PY) и пиронин В (PB) были изучены методом DFT/TD-DFT. Результаты расчетов сравнивались между собой, а также с данными ранее исследованного красителя акридинового красного. Уровень теории O3LYP/6-31++G(d,p)/IEFPCM хорошо воспроизводил экспериментальные спектры водных растворов PY и PB. Согласно расчетам, коротковолновые плечи этих спектров обусловлены вибранными переходами. Боковые группы существенно влияют на набор вибранных переходов. Фотовозбуждение существенно изменяет интенсивность ИК-колебаний. Боковые группы этих ксантеновых красителей (аминодиметил/аминодиэтил) сильно влияют на колебания их хромофоров. НОМО покрывают боковые группы обоих красителей в большей степени, чем LUMO. Конфигурации обеих граничных орбиталей вокруг хромофоров идентичны для PY и PB. Дипольный момент молекул красителя в возбужденном состоянии оказался больше, чем в основном состоянии. В основном состоянии дипольный момент PB в 2,5 раза больше, чем у PY, а в возбужденных состояниях – в 1,7 раза меньше. Моменты перехода PY и PB практически идентичны друг другу. Проведен учет сайт-специфических взаимодействий растворенное вещество-растворитель в виде явного отнесения молекул воды, образующих прочные водородные связи с катионами красителей.

**Ключевые слова:** TD-DFT, вибранные переходы, водный раствор, пиронин У, пиронин В, спектр поглощения.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО Nd:YAG ЛАЗЕРА В БЕЗЫГОЛЬНОЙ ВЕНЕПУНКЦИИ

Ястребова Е.С., Владимиров Р.С.

Институт химической кинетики и горения им. Воеводского ИХКГ СО РАН  
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: kat30cer@kinetics.nsc.ru  
Поступила в редакцию 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0626

**Аннотация.** В последнее время в сфере медицины наблюдается тренд «персонализированной медицины». Основное отличие такой медицины от классической состоит в том, что ваше здоровье оценивают не по средним значениям параметров всех людей, а отслеживают динамику изменения ваших личных параметров. Создание новых подходов к забору пробы с целью повысить привлекательность сдачи медицинских анализов занимает важное место в развитии персонализированной медицины. В данном направлении популярность набирает подход безыгольной венепункции. Данный метод основан на лазерной абляции участка кожи над веной с последующим забором крови. При этом сведено к минимуму повреждение окружающих тканей и образование гематом в результате оплавления на границах воздействия лазерного излучения. В таком подходе главной задачей является умение контролировать глубину и радиус возникающего отверстия – возможности контролируемого получения отверстий в кожных покровах при помощи лазерной абляции. В ходе работы была создана компьютерная модель лазерной абляции для изучаемых объектов с помощью рабочей среды COMSOL Multiphysics. Так же была собрана установка для проведения экспериментов на базе лазера Q-Switch Nd:YAG laser (Класс D). Испытания проводились на нескольких типах мишеней.

**Ключевые слова:** безыгольная венепункция, лазерная абляция, кожные покровы.

### ВВЕДЕНИЕ

Кровь применяется для широкого спектра различных анализов: общий анализ крови, биохимический анализ, анализ на наличие антител к разнообразным антигенам и т.д. Забор венозной крови (венепункция) для этих анализов – одна из самых часто проводимых медицинских процедур, ежедневно по всему миру их проводятся миллионы. Для большого количества людей эта процедура сопряжена с дискомфортом, связанным как с преодолением психологического барьера (например, боязнь игл), так и с физическими неудобствами (например, появление гематом). Ошибки при взятии крови приводят к травмам пациентов, вынуждают искать другие пути доступа и привлекать дополнительный персонал, удлинняя при этом время самой процедуры, создавая ненужные расходы для медицинских учреждений. Работы по модернизации и ускорения процедуры взятия крови уже известны научному сообществу. Так, ученые из Ратгерского университета создали автоматизированную систему забора крови и провели первые испытания [1]. Устройство совмещает в себе ультразвуковой визуализатор и миниатюрные роботизированные манипуляторы для определения сосудов, подходящих для канюляции, и роботизированного позиционирования иглы к точке забора крови. Устройство демонстрирует результаты, сопоставимые с клиническими стандартами, шанс успеха составляет 87% среди всех испытуемых (выборка из 31 человека), среднее время процедуры составляет  $93 \pm 30$  секунд.

В ходе работы над инструментальным комплексом по анализу клеток крови в лаборатории Цитометрии и Биокинетики ИХКГ СО РАН была поставлена задача по разработке нового метода забора крови – безыгольной венепункции. В открытых источниках имеется лишь одно упоминание подобной работы. В 2013 году американская компания NoNeedles Venipuncture опубликовала видеоролик с экспериментом по забору крови из тыльной венозной системы кисти, однако статей по данной теме опубликовано не было.

Схематически процесс безыгольной венепункции можно разделить на три этапа:

1. Локализация вены
2. Образование отверстия
3. Откачка крови

В рамках данной работы изучалась возможность образования отверстия в коже человека при помощи лазера. Принципиальное отличие безыгольной венепункции заключается в методе образования отверстия в коже пациента – вместо прокалывания иглой предлагается использовать эффект лазерной абляции [2]. Использование роботизированной установки, описанной выше, имеет определенные ограничения: иглы необходимо менять после каждой процедуры, поэтому, помимо биологических жидкостей, в мобильном комплексе будут скапливаться использованные иглы, что повысит необходимую частоту обслуживания. Также, в случае неудачной венепункции, у пациента также могут образовываться гематомы. При лазерной абляции образование гематом практически невозможно, так как края образующего канала будут «запечены» [3].

Возможность контролируемого получения отверстий с необходимыми параметрами является определяющим условием в вопросе применимости технологии безыгольной венепункции посредством лазерной абляции. Для получения этой возможности необходимо понимать фундаментальные основы происходящих процессов, а также исследовать связь между характеристиками лазерной установки, оптической системы,

кожных покровов и получаемых отверстий. Таким образом, в данной работе выделяется несколько задач: создание компьютерной модели процесса абляции, создание лазерной установки для проведения экспериментов, получение отверстий на экспериментальных образцах с ожидаемыми параметрами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Конструкция лазерной установки.

В рамках данной работы была смоделирована и сконструирована лазерная установка для проведения экспериментов.

Основой конструкции послужила сотовая оптическая плита, с установленными на ней направляющими рельсами MLAЕ15-3000. Составляющие экспериментальной установки закреплялись на фланцевых каретках MLAЕ15А, после чего устанавливались на направляющие.

Создание моделей и чертежей деталей установки проводилось в программном комплексе SolidWorks. Общий вид всех деталей в собранном виде представлен на рисунках 1 и 2.

В работе использовался лазер LA-15 (Китай). Технические характеристики лазера:

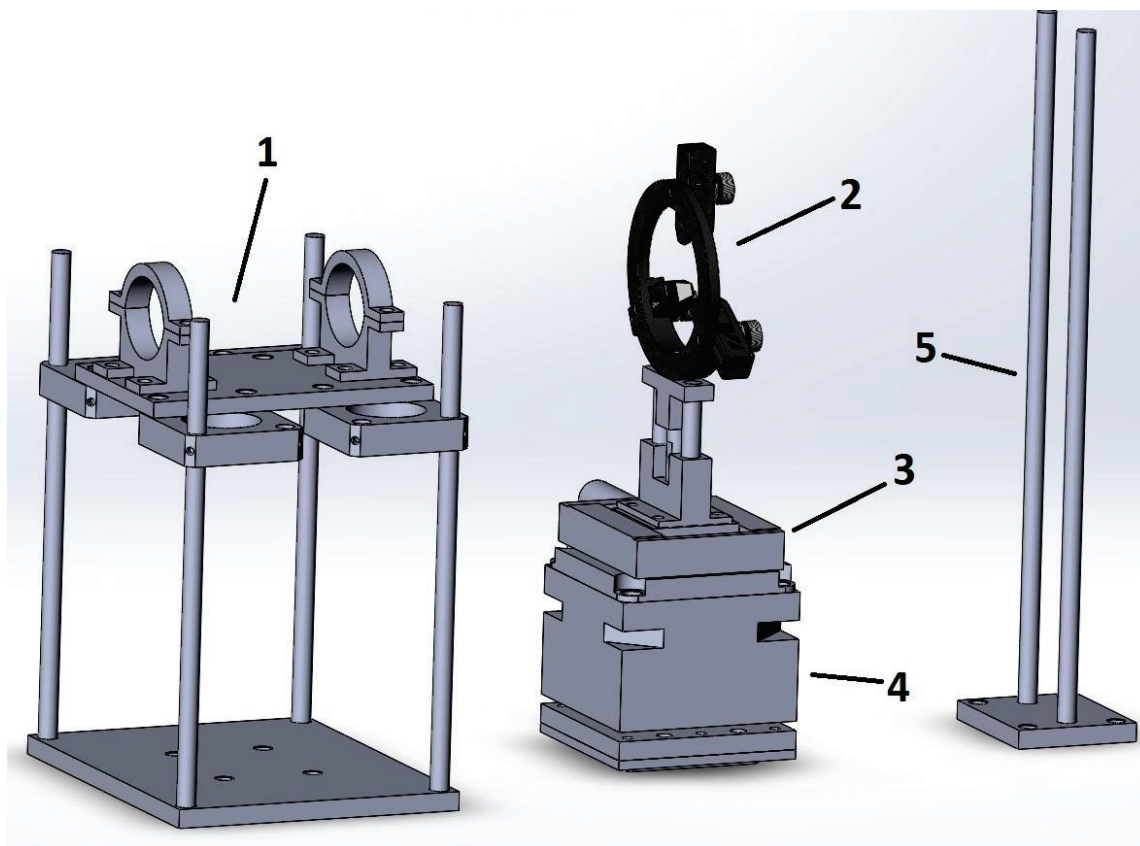
- Тип лазера: Q-Switch Nd:YAG laser (Класс D)
- Длина волны: 1064 нм, 532 нм
- Энергия импульса: до 2000 мДж
- Частота импульсов: 1 – 10 Гц
- Мощность: 2000 Вт

При помощи короткофокусной линзы с фокусным расстоянием  $f = 3.5$  см пучок фокусировался на мишень.

### Методика проведения эксперимента.

Первые эксперименты на лазерной установке проводились на окрашенной бумаге, так как это самый доступный и простой в использовании материал. При попадании лазера на бумагу, черная краска в месте поражения испарялась, образуя белое пятно на черном фоне, что сильно упрощало процесс фокусировки лазера. Получив стабильные результаты на бумажной мишени, было решено использовать куриную и свиную кожу.

Кожа для экспериментов была приобретена в продуктовом магазине. Куриная кожа была срезана с бедренной части курицы, свиная кожа была срезана с брюшной части свиньи. Образцы были разрезаны на куски необходимого размера (не более  $3.5 \text{ см} \times 1.5 \text{ см}$ ), закреплены на специальной подложке, которая в свою очередь была закреплена на держателе мишени. Затем проводилась серия выстрелов до появления отверстия в мишени,



**Рисунок 1.** 3D-модель деталей установки: 1 – крепления для лазера; 2 – держатель для линзы; 3 – одноосевой позиционер; 4 – угловой позиционер; 5 – держатель для мишени

мишень сдвигалась на небольшое расстояние, и снова производилась серия выстрелов. Количество выстрелов, необходимое для образования отверстия, зависит от нескольких параметров: тип мишени, толщина выбранного участка, флуктуации плотности энергии. Для разных типов кожи это число варьируется в следующих пределах:

- Куриная кожа: от 3 до 20 выстрелов
- Свиная кожа: от 15 до 35 выстрелов

Энергия импульса во всех экспериментах составляла 400 мДж.

После проведения нескольких серий обстрелов, подложку с образцом перемещали под микроскоп, где измеряли параметры получившихся отверстий. Так как геометрическая форма отверстий – эллипс, в качестве линейного размера отверстия принята полусумма большего и меньшего радиусов. При проведении экспериментов, образцы оставались неподвижными для того, чтобы образовавшиеся отверстия не изменяли своей формы.

Измерения образующихся при лазерной абляции отверстий проводились на световом микроскопе Zeiss Axio Imager.A1 с объективом Zeiss EC Plan-NEOFLUAR 10x/ 0,3. Для оценки точности измерений выделим два типа погрешностей: инструментальная погрешность – разрешающая способность микроскопа, и субъективная погрешность – ошибки при определении границы отверстий. Зная числовую апертуру объектива, найдем разрешающую способность микроскопа по формуле Аббе:

$$R_{Abbe} = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{600 \text{ нм}}{2 * 0.3} = 1000 \text{ нм} \quad (1)$$

где  $\lambda$  – средняя длина волны лампы микроскопа, NA – числовая апертура объектива. Зная разрешающую способность, можем найти инструментальную погрешность:

$$\Delta_{инстр} = \sqrt{R_{Abbe}^2 + R_{Abbe}^2} = \sqrt{2R_{Abbe}^2} = \sqrt{2}R_{Abbe} \approx 1.4 \text{ мкм} \quad (2)$$

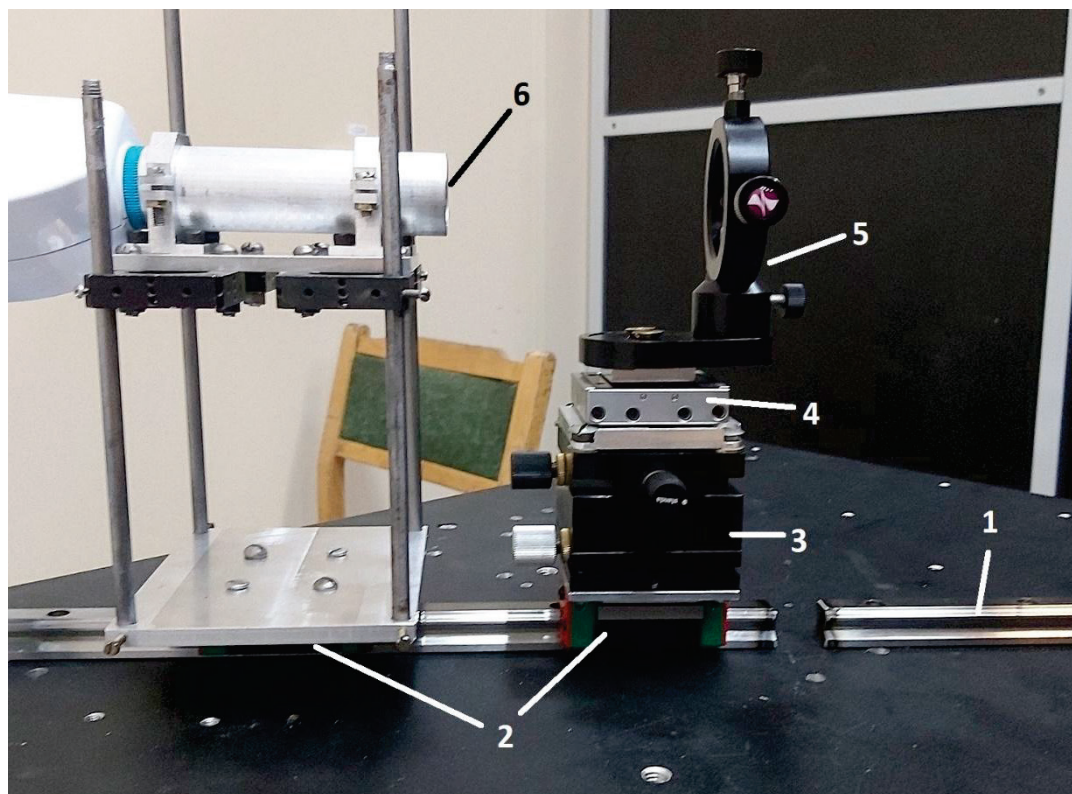
Ошибки определения границы возникают в связи с тем, что граница отверстия представляет собой линию конечной ширины, порядка 3 мкм (рис. 6). Принимая тот факт, что обе точки отрезка могут быть выбраны в некотором интервале, можем найти погрешность:

$$\Delta_{суб} = \sqrt{(1,5 \text{ мкм})^2 + (1,5 \text{ мкм})^2} \approx 2,1 \text{ мкм} \quad (3)$$

Зная обе погрешности, найдем итоговую погрешность:

$$\Delta_{итог} = \sqrt{\Delta_{инстр}^2 + \Delta_{суб}^2} = \sqrt{(1,4 \text{ мкм})^2 + (2,1 \text{ мкм})^2} \approx 2,5 \text{ мкм} \quad (4)$$

Таким образом получаем, что погрешность измерения линейного размера отверстий составляет 0,5 – 1%.



**Рисунок 2.** Лазерная установка в собранном виде: 1 – направляющая; 2 – каретки; 3, 4 – позиционеры; 5 – держатель для линзы; 6 – закрепленный лазер

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Моделирование в среде COMSOL.**

Для лучшего понимания процесса, было решено реализовать компьютерную модель абляции. В качестве рабочей среды был выбран пакет COMSOL Multiphysics – программное обеспечение для моделирования физических и инженерных задач.

COMSOL позволяет решать дифференциальные уравнения, которыми задается физическая задача, методом конечных элементов. В программе существуют несколько разделов физики с заданными в них дифференциальными уравнениями, которые можно накладывать на физические модели при помощи пользовательского интерфейса.

В данной модели использовался модуль Bioheat Transfer, который позволяет моделировать передачу тепла в биологических объектах. Исследуемый образец - цилиндр, которому заданы физические параметры кожи. Теплоперенос в цилиндре задается уравнением

$$\begin{aligned} \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_p \mathbf{u} \cdot \nabla T + \nabla \cdot \mathbf{q} &= Q + Q_{bio} \\ \mathbf{q} &= -k \nabla T \\ Q_{bio} &= \rho_b C_{p,b} \omega_b (T_b - T) + Q_{met} \end{aligned} \quad (5)$$

где  $\rho$  – плотность кожи,  $C_p$  – теплоемкость,  $Q$  – внешний источник тепла,  $Q_{bio}$  – тепло, передаваемое кожному покрову потоком крови и метаболизмом,  $\rho_b$  – плотность крови,  $C_{p,b}$  – теплоемкость крови,  $\omega_b$  – скорость кровотока,  $T_b$  – температура крови.

Метаболизм делится на 2 стадии: катаболизм и анаболизм. Именно в процессе катаболических реакций происходит выделение тепла или накопление энергии в виде молекул АТФ. В процессе катаболизма происходит разложение сложных веществ на более простые или окисление каких-либо веществ. Пример катаболических процессов: окислительное фосфорилирование, цикл Кребса.

На цилиндр наложены начальные условия: начальная температура – 309.6 К (средняя температура тела человека); боковая и нижняя грани цилиндра считаются изолированными, так как подразумевается, что этот цилиндр – это небольшая часть кожного покрова; между верхней границей цилиндра (кожного покрова) и воздухом окружающей среды происходит конвективный теплообмен, коэффициент теплопередачи  $h = 0.1 \frac{W}{m^2 K}$  [4], тепловой поток с поверхности кожи определяется формулой:

$$q_0 = h \cdot (T_{ext} - T) \quad (6)$$

где  $T_{ext}$  – температура окружающей среду. Внешним источником тепла служит лазерное излучение. Лазерное излучение в модели приложено к центру верхней грани, ширина пучка составляет 500 мкм. Модель распространения излучения в поглощающей среде задается законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$\begin{aligned} \frac{\partial I}{\partial z} &= -k_\lambda I \\ k_\lambda &= 4\pi k / \lambda \end{aligned} \quad (7)$$

где  $k_\lambda$  – показатель поглощения материала,  $k$  – мнимый показатель преломления на длине волны 532 нм.

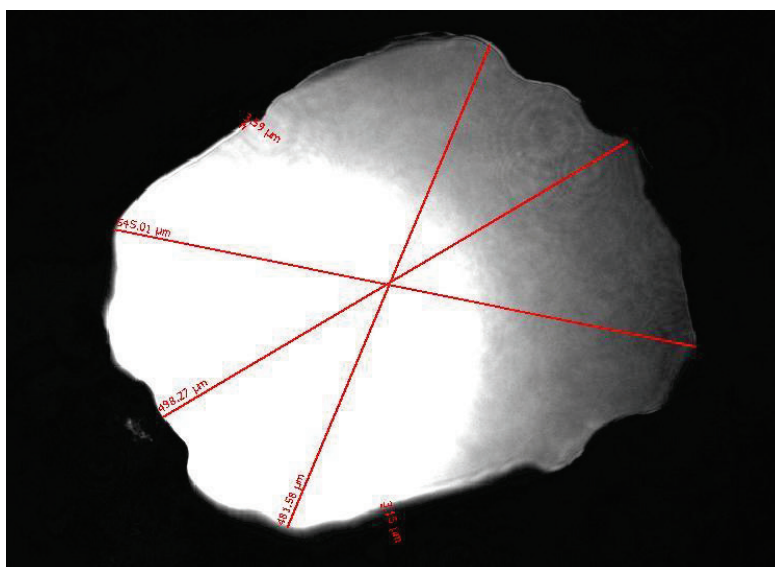
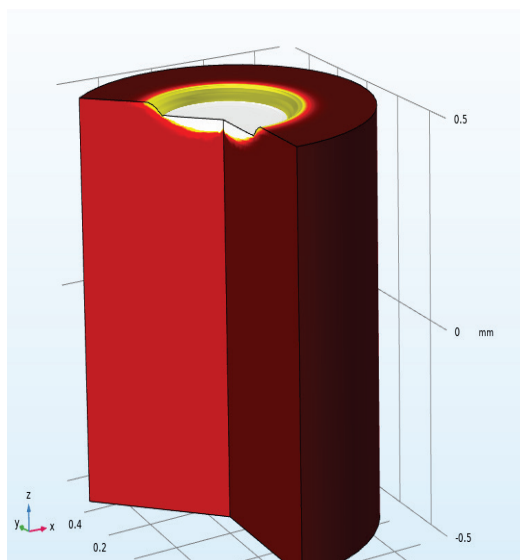


Рисунок 3. Пример получаемого в процессе абляции изображения отверстия под микроскопом



**Рисунок 4.** Вид модели лазерной абляции на человеческой коже в интерфейсе COMSOL.

Суть процесса абляции состоит в испарении вещества с поверхности, однако в функционале COMSOL не заложено подобных механизмов. Для решения этой задачи была использована библиотека Deformed Geometry, которая позволяет изменять геометрию объекта по задаваемым условиям.

Метод конечных элементов, который используется в COMSOL, разбивает геометрический объект на множество элементов, в которых происходит решение уравнений, учитывая граничные условия, состояние окружающих ячеек. Таким образом, каждая элементарная ячейка имеет набор параметров со своими значениями. Одним из ключевых параметров ячейки в данной модели является температура.

Суть реализованной модели состоит в следующем: как только температура элементарной ячейки достигает порогового значения, она должна “испариться”; так как удалить элементарную ячейку нельзя, с помощью Deformed Geometry элементы с критической температурой будут сдвигаться внутрь цилиндра параллельно его оси. Таким образом, в цилиндре будет образовываться “кратер”, как при абляции.

Ограничением этой модели является то, что сетка элементарных ячеек не перенакладывается на объект при его деформировании. Таким образом, при продвижении и искривлении элементарных ячеек, наступает момент, когда стенки ячейки “наезжают” друг на друга, из-за чего дальнейший расчет модели становится невозможным.

Результаты моделирования представлены на рисунке 4 и в таблице 1. Параметры моделирования соответствуют экспериментальным значениям используемого в работе лазера.

#### **Абляция кожных покровов.**

Эксперименты по лазерной абляции проводились на образцах куриной и свиной кожи, также в качестве мишени была использована черная бумага.

Была накоплена статистика по размерам отверстий:

- Куриная кожа – 15 отверстий
- Свиная кожа – 15 отверстий
- Бумажная мишень – 10 отверстий

**Таблица 1.** Параметры и результаты моделирования лазерной абляции на человеческой коже в COMSOL.

Плотность энергии	6.8755E9 Вт/м <sup>2</sup>
Ширина лазерного пучка	500 мкм
Длина волны лазерного излучения	532 нм
Длительность импульса	3 нс
Глубина кратера	0,03 мм

Таблица 2. Параметры отверстий, получившихся после серии стрельб, для разных типов мишеней.

Тип мишени	Сред. знач., мкм	Станд. откл., мкм
Куриная кожа	430	44
Свиная кожа	550	62
Бумажная мишень	470	24

Был посчитан средний размер отверстий для каждого типа мишени, а также стандартное отклонение. Погрешность измерения линейного размера на порядок меньше, чем стандартное отклонение, поэтому в конечном результате оно не учитывалось. Результаты экспериментов приведены в таблице 2.

В медицинских учреждениях, как правило, используют иглы калибра 19G-23G, имеющие внешний диаметр от 640 до 1070 мкм. Таким образом, средний размер полученных отверстий меньше, чем наименьший размер используемых игл. Уменьшая фокусное расстояние линзы, можно добиться уменьшения размера отверстий. Размер отверстия можно уменьшать до тех пор, пока размеры отверстия не начнут влиять на форменные клетки крови (активация тромбоцитов, агрегация эритроцитов).

При теоретическом моделировании скорость испарения вещества равна 100 мкм/импульс. Если принять толщину свиной кожи равной 2.5 мм, исходя из количества требующихся для образования сквозного отверстия импульсов, скорость образования отверстия варьируется в пределах 70 – 170 мкм/импульс. Такое различие возникает ввиду нескольких факторов: в теоретической модели абляция описывалась законом Бугера-Ламберта-Бера, что не в полной мере отражает действительность; компьютерная модель использует параметры человеческой кожи, заложенные в COMSOL.

Исходя из теоретических данных, предполагалось, что при одинаковой энергии импульса, размер отверстий, получаемых на образцах свиной кожи, будет больше, так как ее коэффициент поглощения больше, соответственно больше энергии приходится на единицу массы вещества. Экспериментальные данные подтверждают данное предположение. Из сравнения результатов, полученных на куриной ( $d = 430$  мкм) и свиной коже ( $d = 550$  мкм), следует, что абляция в образце с большим коэффициентом поглощения (и меньшей глубиной проникновения, соответственно) происходит более эффективно [5]. Следовательно, главным приоритетом при выборе лазера служит глубина проникновения излучения в кожу. Используя лазер с меньшей глубиной проникновения, можно уменьшить зону коагуляции и увеличить зону испарения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были исследованы возможности контролируемого получения отверстий в кожных покровах при помощи лазерной абляции. В ходе работы была создана компьютерная модель лазерной абляции, собрана установка для проведения экспериментов на базе лазера LA-15, опыты проводились на нескольких типах мишеней.

Длительность импульса  $t_p = 10$  нс меньше, чем время пробега акустической волны  $t_{зв} \sim 100$  нс (при скорости распространения звука в ткани  $v = 1200$  м/с), следовательно, тип абляции – инерциальное удержание.

Статистически установлен размер отверстий, получаемых при данных параметрах установки, для каждой из мишеней. Результаты экспериментов согласуются с предположениями, сделанными на основе литературных данных.

Статистически показано, что стандартное отклонение размера мишени составляет около 10%. Используя линзу с меньшим фокусным расстоянием, можно уменьшить размер отверстия. Таким образом, можем контролировать размер отверстий, что являлось одной из целей данной работы.

### Список литературы / References:

1. Balter M.L., Leipheimer J.M., Chen A.I., Shrirao A., Maguire T.J., Yarmush M.L. Automated end-to-end blood testing at the point-of-care: Integration of robotic phlebotomy with downstream sample processing. *Technology*, 2018, vol. 06, iss. 02, pp. 59-66, doi: 10.1142/S2339547818500048.
2. Vogel A., Venugopalan V. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chem. Rev.*, 2003, vol. 103, iss. 2, pp. 577-644, doi: 10.1021/cr010379n.
3. Kono T., Ogawa N., Gonome H., Rajagopalan U.M., Yamada J. A local rapid temperature rise model for analyzing the effects of irradiation on human skin in laser treatments. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2021, vol. 171, p. 121078, doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2021.121078.



4. Kurazumi Y., Rezgals L. Convective Heat Transfer Coefficients of the Human Body under Forced Convection from Ceiling. *J Ergonomics*, 2014, vol. 04, iss. 01, doi: 10.4172/2165-7556.1000126.
5. Firdous S. et al. Measurement of an Optical Parameters: Absorption Scattering and Auto-florescence of Skin in vitro. *International J. of Cancer Research*, 2004, vol. 1, iss. 1, pp. 10-15, doi: 10.3923/ijcr.2005.10.15.

#### USE OF MEDICAL Nd:YAG LASER IN NEEDLESS VENIPUNCTION

Yastrebova E.S., Vladimirov R.S.

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS

*Institutskaya, str., 3, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: kat30cer@kinetics.nsc.ru*

Received 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0626

**Abstract.** In recent times, the field of medicine has witnessed a trend towards personalized medicine. The main difference of this approach compared to classical medicine is that your health is evaluated not based on average values of parameters from all individuals, but by tracking the dynamics of changes in your personal parameters. Developing new approaches to sample collection in order to enhance the attractiveness of medical testing plays an important role in the development of personalized medicine. In this regard, the needle-free venipuncture approach is gaining popularity. This method is based on laser ablation of the skin above the vein, followed by blood collection. This minimizes damage to surrounding tissues and reduces the formation of hematomas as a result of laser-induced melting at the boundaries of laser exposure. The main challenge in this approach is the ability to control the depth and radius of the resulting opening - the ability to obtain controlled openings in the skin using laser ablation. In the course of this study, a computer model of laser ablation was created for the studied objects using the COMSOL Multiphysics software. Additionally, an experimental setup was assembled using a Q-Switch Nd:YAG laser (Class D) for conducting experiments on multiple types of targets.

**Key words:** *needleless venipuncture, laser ablation, skin.*

## ВЛИЯНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ КРОВИ ЧЕРЕЗ КАПИЛЛЯР НА ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Ястребова Е.С., Лагунов Т.А.

Институт химической кинетики и горения им. Воеводского ИХКГ СО РАН  
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: kat30cer@kinetics.nsc.ru  
Поступила в редакцию 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0627

**Аннотация.** Тренды персонализированной медицины приводят к необходимости определять норму биологических параметров для каждого отдельного человека. Такая задача требует большой точности получаемых параметров и достаточно частого их измерения. Для обеспечения высокой точности в определении морфологических и функциональных параметров клеток крови хорошо себя зарекомендовал метод сканирующей проточной цитометрии (СПЦ). В рамках данной работы идет разработка системы безыгольной венепункции для обеспечения более комфортных условий забора крови при частом отслеживании своих параметров. Однако, хотя в такой системе и возможно делать в коже отверстия значительно меньше, чем позволяет игла, возникает вопрос могут ли столь маленькие отверстия повлиять на параметры клеток крови, измеряемые на СПЦ. В работе выявлен первый из возможных влияющих на параметры клеток крови факторов – сдвиговое напряжение. Было исследовано поведение параметров эритроцитов при прохождении игл различного диаметра. Проведено моделирование в COMSOL распределения действующих сил на поверхности эллипсоида (как модели тромбоцита и эритроцита) в двух случаях: свободного перемещения клетки в капилляре и для прикрепленной к подложке клетке.

**Ключевые слова:** эритроциты, анионный обмен, сдвиговое напряжение, сканирующий проточный цитометр.

### 1. Введение

В последнее время в сфере медицины наблюдается тренд «персонализированной медицины». Основное отличие такой медицины от классической состоит в том, что ваше здоровье оценивают не по средним значениям параметров всех людей, а отслеживают динамику изменения ваших личных параметров. Сканирующий проточный цитометр является очень мощным методом, позволяющим получить большое количество параметров различных клеток крови с большой точностью и набрать статистику параметров по одному образцу крови [1-4]. Однако, клетки крови могут изменить свои свойства ещё на этапе доставки образца к цитометру (например, тромбоциты начинают активироваться и кровь сворачивается, а для исследования хотелось бы измерить параметры тромбоцитов во время активации без антикоагулянта). Более того при регулярных измерениях необходимо решить вопрос о взятии крови, поскольку многие люди откажутся часто сдавать кровь при помощи игольной венепункции. Существует вариант использования безыгольной венепункции (пробивание отверстия лазером в коже) для забора пробы. Одним из больших преимуществ такого метода является возможность проделывать отверстия размерами меньше внешнего диаметра типичной иглы. Для венепункции обычно используется игла маркировки 22G, внутренний диаметр которой составляет 410 мкм, а внешний 720 мкм (в соответствии с ISO 6009:2016). Использование эффекта лазерной абляции позволит делать в коже отверстия от 400 мкм до 50 мкм при необходимости. Однако, столь малые отверстия (~50 мкм) могут оказывать влияние на параметры клеток крови, поскольку становятся соизмеримы с размерами эритроцитов (5–10 мкм), и в таких капиллярах возрастёт величина сдвигового напряжения, что может приводить к активации тромбоцитов [5-8].

Сдвиговое напряжение  $\tau$ , действующее на клетки, определяется как коэффициент динамической вязкости жидкости  $\mu$  умноженный на производную скорости  $u$  по направлению:

$$\tau = \mu \frac{du}{dr} \quad (1)$$

В случае с капиллярами достаточно медленное течение вязкой жидкости будет подчиняться закону Пуазейля. Тогда скорость течения и величину сдвигового напряжения можно найти как:

$$\begin{cases} u(r) = \frac{p_1 - p_2}{4\mu L} (R^2 - r^2) \\ \tau(r) = \frac{p_1 - p_2}{2L} r \end{cases} \quad (2)$$

где  $\Delta p$  – разность давлений с разных краев частицы,  $R$  – радиус капилляра,  $r$  – расстояние от края капилляра до частицы в потоке,  $L$  – длина исследуемой частицы, находящейся в капилляре. Под влиянием большого сдвигового напряжения (~ $10^6$  Па) активация тромбоцитов начинается уже через короткое время (~ $10^{-5}$  сек), как и инициализация лизиса эритроцитов (~ $10^4$  Па). Однако даже относительно небольшой уровень сдвигового напряжения (~100 Па) при воздействии на клетку дольше чем ~100 сек тоже вызывает активацию тромбоцитов. Похожая зависимость (но с лучшей устойчивостью клеток) замечена и для эритроцитов. Нормальный уровень сдвигового напряжения (т.е. в теле человека) варьируется в пределах 0,3–10 Па [9]. В работе [10] авторы показывают, что активация эритроцитов сдвиговым напряжением происходит благодаря механочувствительным

$\text{Ca}^{2+}$  проницаемым ионным каналам. Причём авторы наблюдали относительно слабую активацию после воздействия сдвигового напряжения величиной  $\sim 1$  Па в течении  $\sim 60$  сек.

Учитывая всё, что известно по поводу влияния сдвигового напряжения на два основных типа клеток крови (эритроциты и тромбоциты) встала задача проверить, сможет ли сканирующий проточный цитометр заметить различия в параметрах клеток, которые были подвержены различным уровням сдвигового напряжения. Дополнительно интересно промоделировать поведение клеток крови в капилляре чтобы правильнее оценивать уровень действующего на клетки сдвигового напряжения.

## 2. Моделирование сдвигового напряжения

Моделирование движения эритроцита и тромбоцита в капилляре проводилось в программном пакете COMSOL. Данный пакет позволяет использовать метод конечных элементов для моделирования физических процессов и взаимодействий. Для поставленной задачи не нужно смотреть на искривления частицы (и тем более на её реальное перемещение по капилляру). Достаточно рассчитать скорости и ускорения частицы для каждого положения с интересующей дискретизацией. Поэтому часть необходимых уравнений была записана вручную.

Модель состояла из двух компонентов (“Component”), размерность обеих 3D (так как использование осесимметричной системы невозможно из-за сдвига частицы относительно центра потока). Первый компонент состоял только из тела, на которое наложена очень точная сетка для вычисления основных необходимых параметров для вращения частицы: масса частицы, положение центра масс и матрица моментов инерции. Все эти параметры вычислялись встроенной функцией “Mass Properties” путём интегрирования по всем элементам сетки. Второй компонент содержал основную модель взаимодействия частицы и жидкости. Для моделирования потока была использована модель течения Навье-Стокса. Так как рассматривается стационарная задача течения (модель установившегося потока), жидкость несжимаема, и инерциальный член пренебрежимо мал, то в итоге можно получить уравнение для «ползущего течения» (“Creeping flow”). Для сходимости такой модели течения достаточно только задать скорости стенок сосуда, скорость втекания жидкости и давление на выходе жидкости из капилляра.

Для задания поведения частицы внутри потока была использована модель вращения твёрдого тела. В программе это задавалось через интерфейс стенки “Wall”, для которой указывался вектор скорости  $\vec{u}_b$ :

$$\begin{cases} \vec{u}_b = \vec{v}_b + \vec{\omega}_b \times \vec{r}_b \\ \vec{r}_b = \vec{r} - \vec{r}_{cm} \end{cases} \quad (3)$$

Линейная скорость клетки  $\vec{v}_b$  находилась из закона Ньютона простым интегрированием действующей на клетку силы по поверхности – формула (4), где  $\vec{n}$  и  $d\vec{s}$  направлены внутрь клетки,  $\mathbf{K}$  – тензор вязких напряжений (“Viscous stress tensor”),  $m$  – масса клетки,  $p$  – давление со стороны жидкости (вычитаем атмосферное  $p_0$  так как внутри клетки такое же давление. В программе для решения дифференциального уравнения используется модуль “Global Equations”. В данной модели скорость клетки напрямую используется как скорость замкнутой стенки в потоке, что влияет на всю матрицу скоростей модели.

$$\begin{cases} \frac{\partial \vec{v}_b}{\partial t} - \frac{1}{m} \oint_s \vec{F}_b \cdot \vec{n} d\vec{s} = 0 \\ \vec{F}_b = -\mathbf{K} \cdot \vec{n} + (p - p_0)\vec{n} \end{cases} \quad (4)$$

Сам тензор вязких напряжений из (4) вычисляется в COMSOL как:

$$\mathbf{K} = \mu \begin{pmatrix} 2 \frac{\partial u_x}{\partial x} & \frac{\partial u_y}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial y} & \frac{\partial u_z}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial z} \\ \frac{\partial u_y}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial y} & 2 \frac{\partial u_y}{\partial y} & \frac{\partial u_y}{\partial z} + \frac{\partial u_z}{\partial y} \\ \frac{\partial u_z}{\partial x} + \frac{\partial u_x}{\partial z} & \frac{\partial u_y}{\partial z} + \frac{\partial u_z}{\partial y} & 2 \frac{\partial u_z}{\partial z} \end{pmatrix} \quad (5)$$

Для нахождения угловой скорости вращения тела  $\vec{\omega}_b$  в модели твёрдого тела была использована теорема о кинетическом моменте [11]:

$$\left( \frac{d\vec{L}}{dt} \right)_{\text{ин.сис}} = \vec{M} \quad (6)$$

где  $\vec{M}$  – момент действия внешних сил,  $\vec{L}$  – кинетический момент тела. Брать производную по времени необходимо в инерциальной системе отсчёта. В системе отсчёта тела эта производная может быть расписана как [12]:

$$\left( \frac{d\vec{L}}{dt} \right)_{\text{ин.сис}} = \left( \frac{d\vec{L}}{dt} \right)_{\text{тело}} + \vec{\omega} \times \vec{L} \quad (7)$$

Зная, что кинетический момент  $\vec{L}$  выражается через тензор инерции тела  $\mathbf{I}$  как  $\vec{L} = \mathbf{I}\vec{\omega}$  и тензор инерции в системе отсчёта тела постоянен, подставим представление кинетического момента в (6) и получим:

$$\mathbf{I} \frac{d\vec{\omega}}{dt} + \vec{\omega} \times \mathbf{I}\vec{\omega} = \vec{M} \quad (8)$$

Так как в COMSOL нет удобного обозначения для тензоров и векторов, распишем (8) по компонентам  $i$  ( $i \in \{x, y, z\}$ ) и получим дифференциальное уравнение на  $\omega$ :

$$M_i - \sum_{k=1}^3 (I_{i,k} \dot{\omega}_k + [I_{i+2,k} \omega_{i+1} - I_{i+1,k} \omega_{i+2}] \omega_k) = 0 \quad (9)$$

где момент внешних сил находим как:

$$\vec{M} = \oint_S \vec{r} \times \vec{F}_b ds \quad (10)$$

### 2.1 Сфероид

Одна из самых распространённых моделей для описания поведения тромбоцита или эритроцита в потоке жидкости – модель капсуля-сфероида с упругими или жёсткими стенками [13-16].

Момент сил, действующий на твёрдый сфероид находящийся в жидкости без силы тяжести можно расписать как:

$$\vec{T}_0 = \mu \hat{Q} \left[ \left( \mathbb{I} \times \vec{u} \right)_0 + \frac{3! \cdot 2}{5!} (D^2 \mathbb{I} \times \vec{u})_0 + \frac{3! \cdot 3}{7!} (D^4 \mathbb{I} \times \vec{u})_0 + \dots \right] \quad (11)$$

где индекс «0» означает, что рассматривается невозмущённый поток в точке, соответствующей центру эллипсоида, а операторы расписываются как:

$$\begin{cases} \mathbb{I} = \vec{i} \cdot a^2 \frac{\partial}{\partial x} + \vec{j} \cdot b^2 \frac{\partial}{\partial y} + \vec{k} \cdot c^2 \frac{\partial}{\partial z} \\ D^2 = a^2 \frac{\partial^2}{\partial x^2} + b^2 \frac{\partial^2}{\partial y^2} + c^2 \frac{\partial^2}{\partial z^2} \end{cases} \quad (12)$$

где  $\{i, j, k\}$  – единичные вектора,  $\{a, b, c\}$  – полуоси эллипсоида (по основным осям  $\{x, y, z\}$  соответственно). Тензор  $\hat{Q}$  для эллипсоида выводится в работе [14] и сокращается в при выводе формулы для  $\omega_z$ , так что не будем его приводить.

В гладком параболическом профиле скоростей из формулы (11) ненулевым является только первое слагаемое. Так как эритроцит и тромбоцит имеют осевую симметрию, их можно представить эллипсоидом вращения. Тогда полуоси будут  $(k \cdot a, a, k \cdot a)$ .

$$\begin{cases} \vec{T} = a^2 \mu \hat{Q} \begin{bmatrix} \partial_y u_z - k^2 \partial_z u_y \\ k^2 \partial_z u_x - k^2 \partial_x u_z \\ k^2 \partial_x u_y - \partial_y u_x \end{bmatrix} \\ \vec{u} = \left( u_{max} \left( 1 - \left( \frac{y - y_0}{R_0} \right)^2 \right), 0, 0 \right) \end{cases} \quad (13)$$

где  $u_{max}$  – скорость в центре потока,  $y_0$  – расстояние между центром потока и центром клетки,  $R_0$  – радиус капилляра. Повернув поток вокруг клетки на угол  $\alpha$  (вокруг оси  $z$ ) получим зависимость раскручивающего момента от угла:

$$\vec{T}(\alpha) = a^2 \mu \hat{Q} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ (1 + (k^2 - 1) \sin^2 \alpha) \frac{2u_{max} y_0}{R_0^2} \end{bmatrix} \quad (14)$$

Для эллипсоида существует также тормозящий момент  $\vec{T}(\omega)$ . Из-за малости отличия плотности клетки от плотности жидкости можно пренебречь инерционным движением клетки (соответственно, влиянием углового ускорения) и рассматривать только «стационарную» зависимость  $\omega(\alpha)$ . В таком случае раскручивающий и тормозящий моменты должны быть равны:

$$\vec{T}(\omega) = a^2 \mu \hat{Q} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ \omega(k^2 + 1) \end{bmatrix} = \vec{T}(\alpha) \quad (15)$$

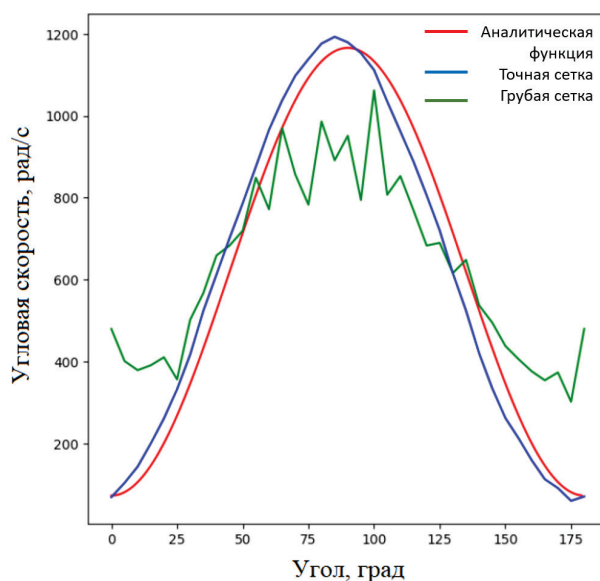
В итоге получается простая аналитическая формула для зависимости  $\omega(\alpha)$ :

$$\omega(\alpha) = (1 + (k^2 - 1) \sin^2 \alpha) \frac{2u_{max} y_0}{R_0^2 (k^2 + 1)} \quad (16)$$

Если попробовать напрямую записать формулу 16 в COMSOL, и посчитать модель с движением эллипсоида по такому закону методом конечных элементов, то увидим хорошую сходимость с аналитическим решением (рис. 1). Естественно, улучшение сетки приближает решение к аналитическому. Для оценки разницы моделей воспользуемся таким параметром как относительная среднеквадратичная разница  $\delta$ . Её можно вычислить по формуле:

$$\delta = \frac{\sqrt{\frac{\sum (\omega_m - \omega_a)^2}{n}}}{\sqrt{\frac{\sum (\omega_a)^2}{n}}} \quad (17)$$

где  $\omega_m$  – набор угловых скоростей для различных положений эллипсоида,  $\omega_a$  – угловая скорость, посчитанная по (16). Для грубой сетки относительная среднеквадратичная разница  $\sim 0,25$  (т.е. 25%). Для более точной сетки относительная среднеквадратичная разница уже уменьшается до  $\sim 0,05$  (5%).

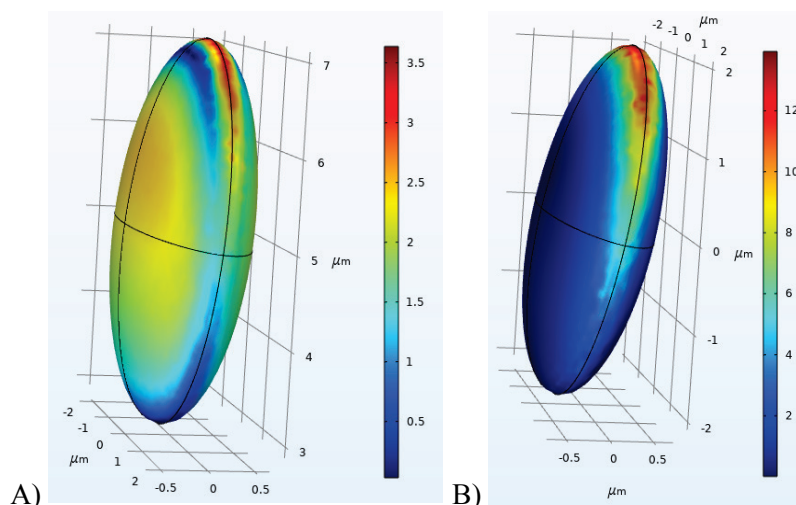


**Рисунок 1.** Сравнение зависимости угловой скорости эллипсоида от угла наклона для аналитической модели и решения COMSOL для двух видов сетки (грубой и более точной)

Моделирование поведения сфероида в жидкости было проведено с использованием конкретных значений: диаметр капилляра 254 мкм (что соответствует внутреннему диаметру измерительной кюветы сканирующего проточного цитометра), средняя скорость потока установлена 1 м/с (учитывая параболический профиль скорости, в центре потока скорость достигает 2 м/с), расстояние клетки от центра потока принято за 5 мкм, отношение полуосей сфероида  $k$  принято за 4 (что приводится в работе [17] как типичное соотношение полуосей для сфероида, описывающего эритроцит).

На рисунке 1 сравнивается зависимость угловой скорости частицы от угла поворота для модели, рассчитанной в COMSOL на грубой и более точной сетки. Относительная среднеквадратичная разница между моделью с точной сеткой и аналитической моделью  $\sim 11\%$ . Можно заметить, что зависимость для точной сетки имеет максимум скорости вращения в положении около  $85^\circ$ . И судя по угловой скорости в положениях около  $0^\circ$  и  $175^\circ$  можно предположить, что произошёл сдвиг зависимостей примерно на  $5^\circ$ . Если провести сдвиг на  $5^\circ$  и рассчитать относительную среднеквадратичную разницу, то точность увеличится (разница  $\sim 1,6\%$ ). Это связано с тем, что в формуле (16) не используется диаметр эллипсоида, а только соотношение полуосей. В моделировании диаметр частицы был взят за 5 мкм, что соответствует маленькому эритроциту или крупному тромбоциту.

Как обсуждалось во введении, активация тромбоцитов зависит от уровня сдвигового напряжения и времени действия этого напряжения. Для проверки этого утверждения в различных работах использовались различные устройства для создания сдвигового напряжения. В целом можно разделить эксперименты на 2 вида: с прикреплёнными клетками и свободно плавающими. Интерес представляет вопрос о схожести воздействия сдвигового напряжения в этих случаях. Для ответа была создана дополнительная модель, в которой клетка



**Рисунок 2.** Распределение сдвигового напряжения (в Па) по поверхности клетки в моделях: А) сфероид в капилляре, В) сфероид, закреплённый на подложке

прикреплялась жёстко к неподвижной подложке, а верхняя подложка перемещалась с постоянной скоростью. Тогда во всём объёме жидкости сдвиговое напряжение одинаково. Скорость была подобрана таким образом, чтобы сдвиговое напряжение в жидкости было равно сдвиговому напряжению в точке, соответствующей центру эллипсоида в капилляре. Сравнение распределений действующего сдвигового напряжения представлено на рисунке 2. И, хотя среднее по поверхности значение сдвигового напряжения отличаются слабо (~1.9 Па для клетки в капилляре и ~3 Па для закреплённой клетки), максимальные значения отличаются более существенно (~4 Па для клетки в потоке и ~13 Па для закреплённой клетки). Это может различным образом повлиять на активацию тромбоцита в таких системах.

**2.2 Форма эритроцита**

Один из наиболее близких к реальной форме эритроцита способов описания формы представлен в работе [14]:

$$z(\rho) = R \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{R}\right)^2 \left(C_0 + C_1 \left(\frac{\rho}{R}\right)^2 + C_2 \left(\frac{\rho}{R}\right)^4\right)} \tag{18}$$

где  $z$  и  $\rho$  – цилиндрические координаты,  $C_0 = 0,187$ ,  $C_1 = 1,035$ ,  $C_2 = -0,774$ . Диаметр клетки снова примем за 5 мкм. После получения зависимости скорости вращения эритроцита от угла необходимо разобраться с вопросом: какой сфероид считать аналогичным данному эритроциту. У эритроцита можно выделить 3 основных параметра, влияющих на скорость вращения: объём, диаметр и толщина. Так как объём эллипсоида напрямую связан с диаметром и толщиной, а для подгонки модели COMSOL варьируется только параметр  $k=a/b$ , то получаем 3 возможных варианта подгонки эритроцита эллипсоидом попарно фиксируя объём, диаметр и толщину. В таблице 1 собраны возможные комбинации параметров, значения  $k$  для каждой комбинации, схематический рисунок и значение относительного среднеквадратичного отклонения  $\delta$ . Наилучшем образом среди перечисленных вариантов эритроцит описывает эллипсоид с аналогичными значениями объёма и диаметра. Если провести аппроксимацию зависимости угловой скорости эритроцита от угла, то получим значение  $k = 2,216 \pm 0,005$ . Относительное среднеквадратичное отклонение для угловой скорости в этом случае уменьшается до 0,5%.

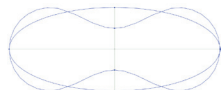
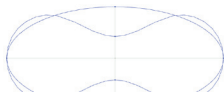
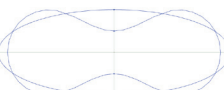
Дополнительно рассмотрим распределение сдвигового напряжения по поверхности эритроцита (рис. 3). Средние по поверхности значения сдвигового напряжения практически не отличаются от эллипсоида. Однако распределение сдвигового напряжения на эритроците в капилляре достаточно сильно отличается в перетяжке и вокруг неё, что может представлять интерес при дальнейшем моделировании упругой деформации эритроцита.

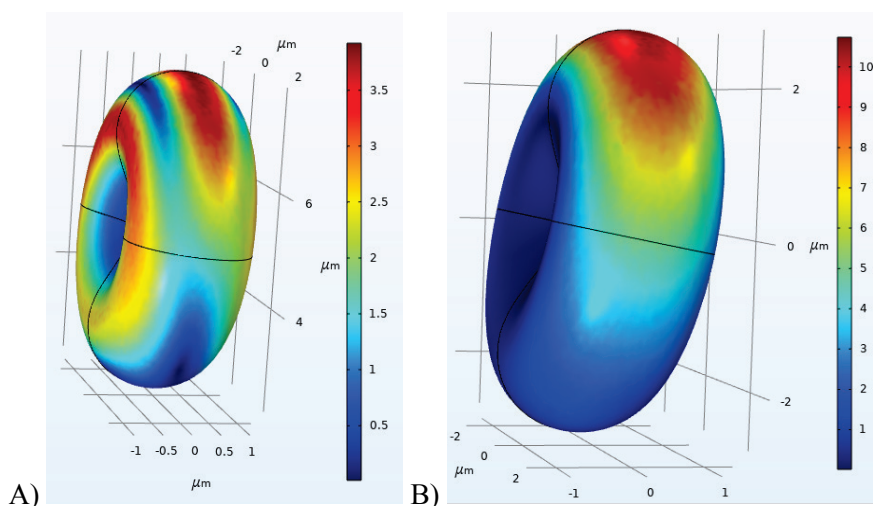
**3. Экспериментальная установка**

**3.1. Пробоподготовка**

В качестве капилляров различного диаметра использовались медицинские иглы и иглы для мезотерапии. Маркировки и параметры игл представлены на рисунке 4 с полученной оценкой сдвигового напряжения согласно уравнению 2. Схема конструкции для крепления игл к шприцу представлена на рисунке 2. Шприц для набора крови закреплялся в вертикальном положении. Снизу аккуратно подводился открытый вакутейнер с кровью донора. К помпе шприца закреплялся подвижный блок, который приводился в движение грузом известной массы, так чтобы помпа двигалась вверх или вниз. Для всех экспериментов помпа была одна, так что она тщательно промывалась сначала в растворе 60% медицинского спирта, после в физрастворе. Вторая часть шприца и иглы менялись для каждой пробы. Сначала набиралось 300 мкл в шприц, которые затем продавливались через ту же иглу в пробирку.

**Таблица 1.** Различные комбинации параметров для описания эритроцита эквивалентным эллипсоидом, получаемые соотношения полуосей  $k$ , схематичный рисунок и относительное среднеквадратичное отклонение в вычислении угловой скорости.

Равные параметры	$k=a/b$	Рисунок	$\delta$
Диаметр и толщина	2.55		~5%
Объём и диаметр	2.15		~1.1%
Объём и толщина	2.77		~7%



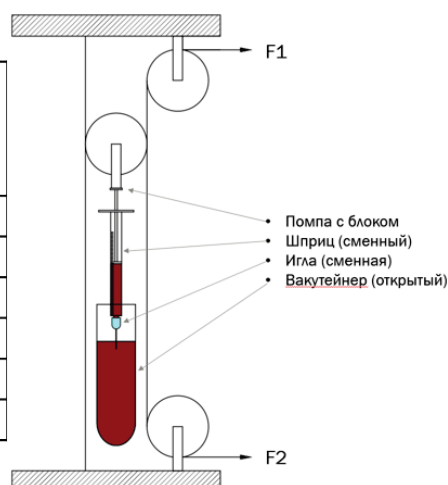
**Рисунок 3.** Распределение сдвигового напряжения (в Па) по поверхности клетки в моделях: А) эритроцит в капилляре, В) эритроцит, закреплённый на подложке

Образец крови донора был собран в одноразовый пластиковый вакутейнер с антикоагулянтом EDTA в соотношении кровь:EDTA как 9:1. Письменное информированное согласие было получено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Из пробы, прошедшей через иглу, набиралось по 1 мкл в 3 пробирки для 3-х измерений. Первую пробу разбавляли физраствором в соотношении физраствор:проба как 500:1. Вторая проба разбавлялась физраствором в соотношении физраствор:проба как 10:1, из неё набиралось 5 мкл и добавлялось в 500 мкл лизирующего раствора (150 мМ NH<sub>4</sub>Cl). Третья проба разбавлялась физраствором в соотношении физраствор:проба как 10:1, из неё набиралось 5 мкл и добавлялось в 500 мкл раствора нифедипина (0,01%). Перед измерением на проточном сканирующем цитометре в каждую пробу добавлялись полистирольные микросферы диаметром 3.7 мкм для инициализации цитометра.

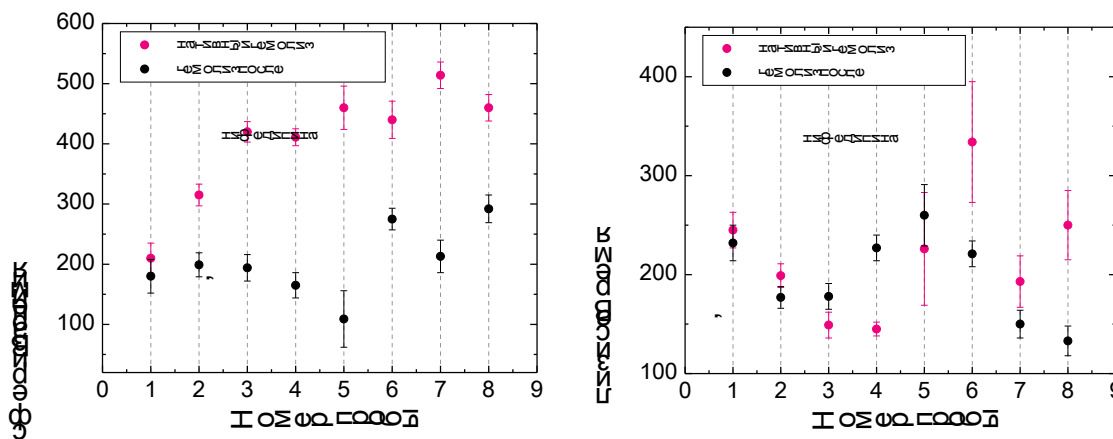
### 3.2 Сканирующий проточный цитометр

Оптическая система сканирующего проточного цитометра (рис. 5) отличается от классического цитометра возможностью записи индикатрисы частицы (зависимости интенсивности рассеянного частицей света от угла светорассеяния). Луч лазера 1, проходя через поляризатор, четвертьволновую пластинку и собирающую линзу, распространяется вдоль потока жидкости в измерительной кювете. Будучи рассеянным на частице, свет падает на полусферическое зеркало. В зависимости от положения частицы в кювете, только рассеянный под определённым углом свет попадает на зеркало с отверстием по центру и попадает на фотодетектор 1 (ФД1), который является фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Такая система позволяет получать индикатрису в углах от 10° до 70°. По азимутальному углу (в плоскости перпендикулярной движению частицы) происходит интегрирование, так как ФЭУ собирает весь сигнал, прошедший диафрагму. При выходе из рабочей зоны частица пересекает триггерный луч (исходящий из лазера 2 на рис. 5). Маска перед ФД2 отсекает постоянное излучение лазера 2, что позволяет регистрировать только рассеянный частицей сигнал.

Маркировка	Внутренний диаметр, мм	Длина, мм	Эффективное сдвиговое напряжение, Па	Эффективное время действия, сек
22G	0.41 ± 0.02	38	~94	~0.05
23G	0.33 ± 0.02	38	~76	~0.07
26G	0.26 ± 0.02	12	~190	~0.011
30G	0.16 ± 0.02	8	~170	~0.013
31G	0.13 ± 0.02	6	~190	~0.011
32G	0.11 ± 0.02	12	~80	~0.06



**Рисунок 4.** Схема экспериментальной установки. Вакутейнер был закреплён для аккуратного подведения крови к игле, шприц закреплён вертикально. Шприц и игла менялись перед каждой экспериментальной группой, помпа с закреплённым блоком тщательно промывалась



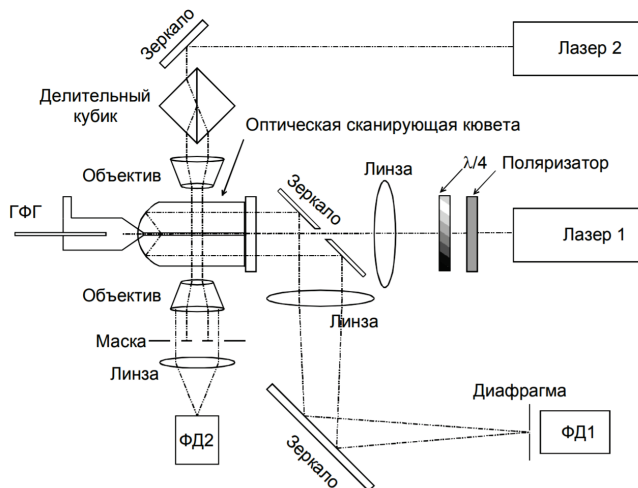
**Рисунок 6.** Времена сферизации и лизиса до и после воздействия нифедипина. Номера пробы представлены следующим образом: 1) со стандартной пробоподготовкой, 2) без иглы, 3-8) используя иглы в соответствии с рисунком 4.

**4. Результаты**

Полученные индикатрисы частиц (эритроцитов и полистирольных микросфер диаметром 3.7 мкм) были обработаны программой, для получения параметров эритроцитов. Параметры каждой клетки были собраны в таблицу и обработаны статистически в программе Origin 2018. В эксперименте было использовано 8 вариантов воздействия на эритроциты: 1 – стандартный забор пробы из вакутейнера пипеткой, 2 – забор крови в шприц без иглы, 3-8 – пропускание крови через иглы.

Сканирующий проточный цитометр дает возможность измерить предельную растяжимость мембраны и количество анионных обменников эритроцита [18]. Для этого эритроциты помещают в лизирующий раствор, согласно протоколу пробоподготовки описанному выше, для запуска процесса гемолиза. Во время обработки данных отслеживают относительное количество сферизованных эритроцитов.

Были получены графики зависимости времени сферизации и времени лизиса эритроцитов в лизирующем растворе (рис. 6). Наблюдается некая зависимость от диаметра капилляра для времени сферизации. Это свидетельствует об уменьшении количества активно работающих анионных обменников под воздействием сдвигового напряжения. При выдержке пробы с эритроцитами в растворе нифедипина мы можем видеть на рисунке 6 уменьшения времени сферизации (результаты представлены черными точками), что свидетельствует об увеличении числа активно работающих анионных обменников. Такой результат является ожидаемым, так как нифедипин неселективно блокирует кальциевые каналы и насосы на мембране эритроцита. Это приводит к накоплению кальция внутри клетки, модификации белков и увеличения их суммарной скорости работы – сферизация происходит быстрее [3]. Однако, можно заметить, что воздействие нифедипина нивелирует величину эффекта прохождения эритроцитами узких игл. Но даже при компенсаторном эффекте от активации препаратом, наблюдается увеличение скорости сферизации для трех самых узких игл диаметрами 0,11÷0,16 мм. Из этого можно сделать вывод, что такие диаметры капилляра приводят к необратимым изменениям свойства мембраны – рабочей конформации анионного обменника эритроцитов. Можно также отметить, что эффект слабо выражен на временах лизиса, которые отвечают за предельную растяжимость мембраны. Характер изменения времени



**Рисунок 5.** Схема оптической системы проточного сканирующего цитометра



лизиса ведет себя неоднозначно от диаметра иглы. При этом наблюдается различное превышение времени лизиса для игл с минимальными диаметрами. Наблюдаемые результаты свидетельствуют в пользу гипотезы об изменении рабочего состояния анионных обменников при прохождении узких капилляров, что приводит к уменьшению скорости их работы, тем самым к увеличению времени, которое требуется эритроцитам для достижения сферической формы в процессе гемолиза.

### 5. Заключение

В работе проведено моделирование поведения частицы в потоке жидкости при помощи программного пакета COMSOL. Создана база для изучения деформаций частицы в потоке, получены сдвиговые напряжения, возникающие в системах с различными конфигурациями системы. Показано, что, хотя среднее действующее значение сдвигового напряжения для частицы в потоке и прикрепленной к подложке одинаково, распределение сил по поверхности различно, что в случае тромбоцита может приводить к различным уровням активации. Также показано, что при вычислении скорости вращения эритроцита в потоке существует эквивалентный эллипсоид, имеющий аналогичную зависимость скорости вращения от угла. В случае изучения этой зависимости стоит использовать компьютерное моделирование при положении частицы относительно центра потока соизмеримом с размерами частицы. Однако для оценки вращения реальных эритроцитов достаточно использовать формулу 16 и брать эквивалентный сфероид с параметрами, которые проще измерить для эритроцита (так как максимальная ошибка составит не более 7%).

Эксперимент показал, что сканирующий проточный цитометр способен зафиксировать изменение скорости работы анионного обмена эритроцитов в зависимости от конфигурации подачи пробы. Так как при этом времена сферизации и лизиса эритроцитов претерпевают изменения, что свидетельствует о модификации рабочего состояния анионного обменника в результате сдвигового напряжения, возникающего в узких капиллярах.

### Список литературы / References:

1. Robinson J.P., Roederer M. Flow cytometry strikes gold. *Science*, 2015, vol. 350, iss. 6262, pp. 739-740, doi: 10.1126/science.aad6770.
2. Giesecke C., Feher K., Von Volkmann K., Kirsch J., Radbruch A., Kaiser T. Determination of background, signal-to-noise, and dynamic range of a flow cytometer: A novel practical method for instrument characterization and standardization: Determination of Flow Cytometer's SNR and DNR. *Cytometry*, 2017, vol. 91, iss. 11, pp. 1104-1114, doi: 10.1002/cyto.a.23250.
3. Yastrebova E.S., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Maltsev V.P., Chernyshev A.V. Proposed Dynamics of CDB3 Activation in Human Erythrocytes by Nifedipine Studied with Scanning Flow Cytometry. *Cytometry, Part A*, doi: 10.1002/cyto.a.23918.
4. Gilev K.V. et al. Advanced consumable-free morphological analysis of intact red blood cells by a compact scanning flow cytometer. *Cytometry, Part A*, 2017, vol. 91, iss. 9, pp. 867-873, doi: 10.1002/cyto.a.23141.
5. Lee H., Kim G., Lim C., Lee B., Shin S. A simple method for activating the platelets used in microfluidic platelet aggregation tests: Stirring-induced platelet activation. *Biomicrofluidics*, 2016, vol. 10, iss. 6, p. 064118, doi: 10.1063/1.4972077.
6. Shankaran H., Alexandridis P., Neelamegham S. Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von Willebrand factor in suspension. *Blood*, 2003, vol. 101, iss. 7, pp. 2637-2645, doi: 10.1182/blood-2002-05-1550.
7. Rahman S.M., Eichinger C.D., Hlady V. Effects of upstream shear forces on priming of platelets for downstream adhesion and activation. *Acta Biomaterialia*, 2018, vol. 73, pp. 228-235, doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.002.
8. Sheriff J., Soares J.S., Xenos M., Jesty J., Bluestein D. Evaluation of Shear-Induced Platelet Activation Models Under Constant and Dynamic Shear Stress Loading Conditions Relevant to Devices. *Ann Biomed Eng*, 2013, vol. 41, iss. 6, pp. 1279-1296, doi: 10.1007/s10439-013-0758-x.
9. Koutsiaris A.G. et al. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology*, 2007, vol. 44, iss. 5-6, pp. 375-386.
10. Ilkan Z., Wright J.R., Goodall A.H., Gibbins J.M., Jones C.I., Mahaut-Smith M.P. Evidence for shear-mediated Ca<sup>2+</sup> entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, vol. 292, iss. 22, pp. 9204-9217, doi: 10.1074/jbc.M116.766196.
11. Alemu Y., Bluestein D. Flow-induced Platelet Activation and Damage Accumulation in a Mechanical Heart Valve: Numerical Studies. *Artificial Organs*, 2007, vol. 31, iss. 9, pp. 677-688, doi: 10.1111/j.1525-1594.2007.00446.x.
12. Kroll M.H., Hellums J.D., McIntire L.V., Schafer A.I., Moake J.L. Platelets and shear stress. *Blood*, 1996, vol. 88, iss. 5, pp. 1525-1541.
13. Barthes-Biesel D. Motion of a spherical microcapsule freely suspended in a linear shear flow. *J. Fluid Mech.*, 1980, vol. 100, iss. 4, pp. 831-853, doi: 10.1017/S0022112080001449.
14. Barthes-Biesel D., Rallison J.M. The time-dependent deformation of a capsule freely suspended in a linear shear flow. *J. Fluid Mech.*, 1981, vol. 113, iss. 1, p. 251, doi: 10.1017/S0022112081003480.
15. Vahidkhan K., Diamond S.L., Bagchi P. Platelet Dynamics in Three-Dimensional Simulation of Whole Blood. *Biophysical Journal*, 2014, vol. 106, iss. 11, pp. 2529-2540, doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.028.
16. Doddi S.K., Bagchi P. Three-dimensional computational modeling of multiple deformable cells flowing in microvessels. *Phys. Rev. E*, 2009, vol. 79, iss. 4, p. 046318, doi: 10.1103/PhysRevE.79.046318.

17. Gilev K.V., Yurkin M.A., Chernyshova E.S., Strokotov D.I., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Mature red blood cells: from optical model to inverse light-scattering problem. *Biomed Opt Express*, 2016, vol. 7, iss. 4, pp. 1305-1310, doi: 10.1364/BOE.7.001305.

18. Yastrebova E.S. et al. Erythrocyte lysis and angle-resolved light scattering measured by scanning flow cytometry result to 48 indices quantifying a gas exchange function of the human organism. *Cytometry Pt A*, 2022, doi: 10.1002/cyto.a.24554.

## INFLUENCE OF THE BLOOD FLOW THROUGH THE CAPILLARY ON THE MAIN PARAMETERS OF ERYTHROCYTES

**Yastrebova E.S., Lagunov T.A.**

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS

*Institutskaya, str., 3, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: kat30cer@kinetics.nsc.ru*

Received 19.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0627

**Abstract.** The trends in personalized medicine lead to the necessity of determining the normal range of biological parameters for each individual. This task requires high precision in the obtained parameters and frequent measurements. To ensure high accuracy in determining the morphological and functional parameters of blood cells, the method of scanning flow cytometry (SFC) has proven to be effective. Within this study, a needle-free venipuncture system is being developed to provide more comfortable conditions for blood collection during frequent monitoring of one's parameters. However, although such a system allows for much smaller skin punctures than a needle, the question arises as to whether these small openings can affect the blood cell parameters measured by SFC. This study identified the first potential factor influencing blood cell parameters - shear stress. The behavior of erythrocyte parameters was investigated as needles of different diameters passed through them. COMSOL modeling was conducted to analyze the distribution of forces acting on the surface of an ellipsoid (as a model for platelets and erythrocytes) in two scenarios: free cell movement in a capillary and for a cell attached to a substrate.

**Key words:** *erythrocytes, anion exchange, shear stress, scanning flow cytometer.*

## НЕСТЕРОИДНЫЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ МЕЛОКСИКАМ ОСЛАБЛЯЕТ ЭФФЕКТ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В.<sup>1</sup>, Крутецкая З.И.<sup>1</sup>, Антонов В.Г.<sup>2</sup>, Крутецкая Н.И.<sup>1</sup>, Бадюлина В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет  
Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: a.melnitskaya@spbu.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

Литовская ул., 2, г. Санкт-Петербург, 194100, РФ

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0628

**Аннотация.** Статья посвящена исследованию редокс-регуляции трансэпителиального транспорта ионов в осморегулирующих эпителиях. Фармакологический аналог окисленного глутатиона препарат глутоксим® обладает антиоксидантными и радиопротекторными свойствами и широко применяется в качестве иммуномодулятора и цитопротектора в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний. С использованием метода фиксации потенциала исследовано влияние ингибитора циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты - нестероидного противовоспалительного препарата мелоксикама на эффект глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки *Rana temporaria*. Впервые показано, что преинкубация кожи лягушки с мелоксикамом существенно снижает стимулирующее действие глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ . Полученные данные свидетельствуют об участии циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты в действии глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия глутоксима и мелоксикама, и могут быть полезны для применения этих препаратов в клинической практике.

**Ключевые слова:** транспорт  $\text{Na}^+$ , глутоксим, мелоксикам, эпителий кожи лягушки.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны [1]. Транспорт  $\text{Na}^+$  в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие различные  $\text{Na}^+$  - транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса. Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах этих белков, определяют их редокс-чувствительность и являются мишенью для действия внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов.

Фармакологический аналог окисленного глутатиона (GSSG) препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) широко используется в качестве иммуномодулятора и цитопротектора в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [2]. Этот препарат оказывает комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы его действия далеки от полного понимания.

Ранее нами впервые было обнаружено, что GSSG и глутоксим модулируют транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки [3]. Обнаружено, что приложение этих агентов со стороны апикальной поверхности кожи подавляет транспорт  $\text{Na}^+$ , тогда как при добавлении со стороны базолатеральной поверхности кожи, GSSG и глутоксим действуют как инсулиномиметики и стимулируют трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ . В дальнейшем было показано, что в регуляции GSSG и глутоксимом транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки, также как и в сигнальных каскадах, запускаемых инсулином, принимают участие тирозинкиназы и фосфатидилинозитолкиназы [4], протеинкиназа С [5], серин/треониновые протеинфосфатазы PP1/PP2 [6], а также микротрубочки и актиновые филаменты [6,7]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ , во многом не ясны.

Известно, что арахидоновая кислота (АК) и ее производные являются важными сигнальными молекулами, выступающими в качестве местных гормонов и медиаторов, играющих важную роль в регуляции различных физиологических и патофизиологических процессов [8]. Выделяют три основных пути метаболизма АК: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром P-450-зависимый) [8]. В почках и других реабсорбирующих эпителиях АК и ее производные (преимущественно продукты циклооксигеназного пути окисления АК – простагландины) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды [9,10]. Установлено, что многие ионные каналы, в том числе амилорид-чувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  через реабсорбирующие эпителии, являются мишенями как для самой АК, так и для ее метаболитов [11-13]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции глутоксимом транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

В экспериментах использовали ингибитор циклооксигеназ мелоксикам (4-гидрокси-2-метил-N-(5-метил-1,3-тиазол-2-ил)-2Н-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид-1,1-диоксид)–нестероидный противовоспалительный препарат из группы оксикамов (производные эноловой кислоты). Мелоксикам широко применяется в клинической практике в качестве нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), противоревматического препарата и анальгетика. Мелоксикам относится к НПВС нового поколения, значительно более селективен к циклооксигеназе 2, чем к циклооксигеназе 1, благодаря чему он обладает менее выраженным побочным действием на почки и желудочно-кишечный тракт [14].

### МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга («World Precision Instruments, Inc.», Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl<sub>2</sub>, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 °С).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ). Для измерения ВАХ на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал ( $V_T$ ) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи  $V_{OC}$  ( $V_{OC} = V_T$  при трансэпителиальном токе  $I_T = 0$ ). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания  $I_{SC}$  ( $I_{SC} = I_T$  при  $V_T = 0$ ),  $V_{OC}$  и трансэпителиальную проводимость  $g_T$ . Транспорт  $Na^+$  оценивали как амилорид-чувствительный  $I_{SC}$ .

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы амилорида (10 мМ) и мелоксикама (20 мМ) готовили на воде. Глутоксим предоставлен фирмой «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург. Маточный раствор глутоксима (50 мг/мл) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде  $x \pm s_x$ . Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ . На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют:  $I_{SC} = 9,15 \pm 2,12$  мкА;  $V_{OC} = -24,26 \pm 3,12$  мВ;  $g_T = 0,38 \pm 0,01$  мСм.

Показано, что глутоксим (200 мкг/мл), приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулирует транспорт  $Na^+$ ; данные приведены в таблице 1 и на рисунке 1а. Полученные результаты согласуются с данными литературы о способности GSSG и его фармакологических аналогов оказывать рецептор-опосредованное влияние на клеточные процессы. Так, в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию (лиганд-независимую активацию) рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [15,16]. Можно предположить, что GSSG и его фармакологические аналоги могут взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами  $\alpha$ -субъединиц инсулинового рецептора, вызывать трансактивацию рецептора и запускать сигнальный каскад, приводящий к активации  $Na^+$ -транспортирующих белков и стимуляции транспорта  $Na^+$ .

Впервые показано, что преинкубация базолатеральной поверхности кожи с мелоксикамом (40 мкМ) в течение 30 мин перед добавлением к той же поверхности кожи 200 мкг/мл глутоксима, существенно ослабляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $Na^+$  (данные приведены в табл. 2, на рис. 1б).

Известно, что транспорт  $Na^+$  в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные  $Na^+$ -транспортирующие белки (амилорид-чувствительные эпителиальные  $Na^+$ -каналы (ENaC),  $Na^+$ - $K^+$  -АТФазы и  $Na^+$ / $H^+$ -обменники), локализованные в различных

**Таблица 1.** Влияние глутоксима на электрические характеристики кожи лягушки

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
Глутоксим 200 мкг/мл	$I_{SC}$	↑ 36,24 ± 10,08
	$V_{OC}$	↑ 39,13 ± 12,24
	$g_T$	↑ 2,35 ± 0,12

Стрелками обозначено увеличение (↑) значений электрических характеристик кожи после приложения глутоксима в концентрации 200 мкг/мл со стороны базолатеральной поверхности кожи лягушки по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов *n* (число измерений) = 10

**Таблица 2.** Влияние глутоксима на электрические характеристики кожи лягушки, предварительно обработанной 40 мкМ мелоксикама

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
Глутоксим, 200 мкг/мл	$I_{sc}$	$\uparrow 17,39 \pm 5,22$
	$V_{oc}$	$\uparrow 20,34 \pm 12,26$
	$g_T$	$\uparrow 3,01 \pm 0,06$

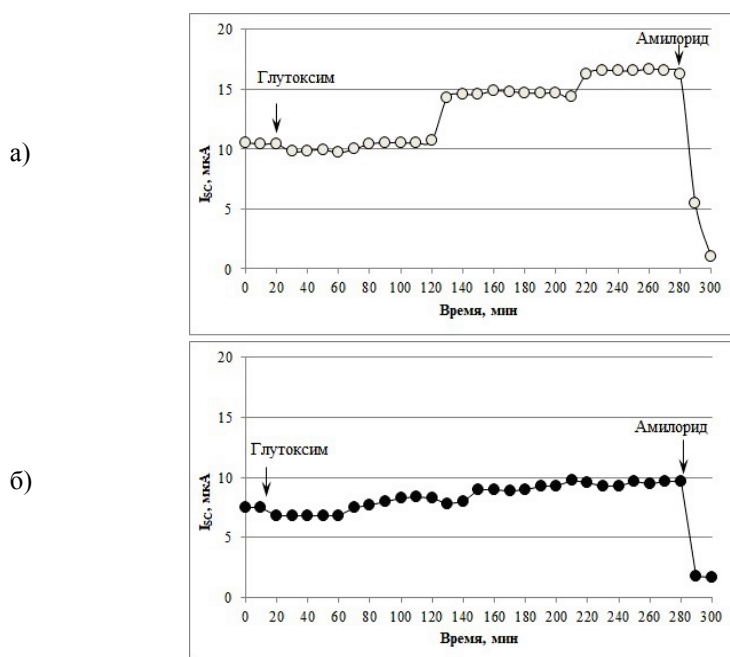
Стрелками обозначено увеличение ( $\uparrow$ ) значений электрических характеристик кожи после приложения глутоксима по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов  $n$  (число измерений) = 10

мембранах клетки. Добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта  $Na^+$ , что указывает на то, что влияние глутоксима на транспорт  $Na^+$  связано, в основном, с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано модулирующее влияние ингибитора циклооксигеназ мелоксикама на эффект глутоксима на транспорт  $Na^+$  в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты свидетельствуют об участии циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты в регуляторном действии глутоксима на транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. Результаты настоящей работы и ранних работ [3-7] позволяют предположить, что глутоксим может взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, включающий тирозинкиназы, фосфатидилинозитолкиназы, протеинкиназу C, протеинфосфатазы, элементы актинового и тубулинового цитоскелета, а также продукты и/или ферменты циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты, что приводит к стимуляции транспорта  $Na^+$  в коже лягушки.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Хорошо известно, что ингибирование синтеза простагландинов НПВС модулирует влияние других гормонов и биологически активных веществ, таких как ангиотензин, норэпинефрин и вазопрессин, на скорость почечного кровотока и клубочковой фильтрации, а также на уровни экскреции натрия и воды [17]. Подобные эффекты НПВС являются причиной почечной токсичности этих препаратов и часто приводят к развитию анальгетической нефропатии на фоне приема НПВС [18].

В то же время, необходимо учитывать, что не все биологические эффекты мелоксикама связаны с его способностью ингибировать циклооксигеназы. Результаты недавних исследований указывают на потенциальные антиоксидантные свойства мелоксикама. Обнаружено, что мелоксикам ингибирует апоптоз клеток за счет усиления антиоксидантных систем клетки [19]. Этот же механизм считается ответственным за нейропротекторное действие препарата и его низкую гепатотоксичность [20]. Нейропротекторный эффект не



**Рисунок 1.** Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{sc}$  через кожу лягушки при приложении глутоксима к базолатеральной поверхности нативной кожи (а) и кожи лягушки, предварительно обработанной 40 мкМ мелоксикама (б). В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных  $Na^+$ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

наблюдался у других типичных НПВС, таких как индометацин и ибупрофен, а также более селективных ингибиторов циклооксигеназы 2. Кроме того, обнаружено, что нейропротекторный эффект мелоксикама индуцируется за счет активации защитного сигнального каскада, в который вовлечены фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K/Akt путь), и осуществляется без участия циклооксигеназ [21]. Ранее, нами было показано, что регуляторное действие глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки осуществляется также при участии фосфатидилинозитол-3- и 4-киназ [4]. Таким образом, можно предположить конкурентное взаимодействие между глутоксимом и мелоксикамом как на уровне антиоксидантных свойств указанных препаратов, так и на уровне регулируемых ими сигнальных каскадов. Тем не менее, этот вопрос требует дальнейшего изучения, включая возможные побочные эффекты и лекарственные взаимодействия.

Известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения глутоксима и НПВС. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что совместное применение глутоксима и мелоксикама нежелательно, т.к. может привести к ослаблению терапевтического эффекта глутоксима. Полученные результаты способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия глутоксима и производных эноловой кислоты, и могут быть полезны для применения этих препаратов в клинической практике.

*Работа выполнена в рамках плановых тем Кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и Кафедры биохимии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, а также Договора на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03-20.*

#### Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*. L.: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. Zhukov O.B., Zubarev A.R., Mezentseva M.V., Andryushkova Yu.A., Ose I.V. Modern aspects of immunomodulating therapy for those sick with recurrent infections of sexual transmission and with antibiotic-resistant bacterial prostatitis. *Vracheb. Sosl.*, 2004, vol. 5/6, pp. 51-56.
3. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide-containing agents on the  $\text{Na}^+$  transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2008, vol. 421, pp. 235-238.
4. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G., Butov S.N. Involvement of tyrosine and phosphatidylinositol kinases in oxidized glutathione and glutoxim regulation of  $\text{Na}^+$  transport in frog skin. *Cell and Tissue Biology*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 273-279.
5. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E. The involvement of protein kinase C in the effect of oxidized glutathione and glutoxim on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2009, vol. 3, no. 3, pp. 323.
6. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of glutoxim on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin: the role of cytoskeleton. *Cell and Tissue Biology*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 248-253.
7. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The involvement of microtubules in the glutoxim regulation of  $\text{Na}^+$  transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2012, vol. 445, pp. 227-229.
8. Wang B., Wu L., Chen J., Dong L., Chen C., Wen Z., Hu J., Fleming I., Wang D.W. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduc. Target. Ther.*, 2021, vol. 26, no. 6(1), p. 94, doi: 10.1038/s41392-020-00443-w.
9. Els W.J., Helman S.H. Dual role of prostaglandins ( $\text{PGE}_2$ ) in regulation of channel density and open probability of epithelial  $\text{Na}^+$  channels in frog skin (*R. pipiens*). *J. Membr. Biol.*, 1997, vol. 155, no. 1, pp. 75-87, doi: 10.1007/s002329900159.
10. Shakhmatova E.I., Kuznetsova A.A., Prutskova N.P., Bogolepova A.E., Natochin Iu.V. The effect of cyclooxygenase inhibitors on ion and water transport in the human kidney and frog skin and bladder. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova*, 1997, vol. 83, no. 10, pp. 68-75.
11. Ordway R.W., Singer J.J., Walsh J.V. Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.*, 1991, vol. 14, pp. 96-100.
12. Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, vol. 155, pp. 14-16.
13. Pavlov T.S., Ilatovskaya D., Levchenko V., Mattson D.L., Roman R.J., Staruschenko A. Effects of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid on the epithelial sodium channel (ENaC). *Am. J. Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. F672-F681.
14. Engelhardt G., Bögel R., Schnitzler Chr., Utzmann R. Meloxicam: Influence on arachidonic acid metabolism. Part I. In vitro findings. *Biochem. Pharmacol.*, 1996, vol. 51, pp. 29-38.
15. Vasilenko K.P., Burova E.B., Antonov V.G., Nikolskii N.N. Oxidized glutathione induces activation of the epidermal growth factor receptor and MAP kinases ERK 1, 2. *Tsitologiya*, 2006, vol. 48, no. 6, pp. 500-507.
16. Burova E.B., Vasilenko K.P., Antonov V.D., Nikolskii N.N. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim in A431 cells. *Dokl. Biol. Sci.*, 2005, vol. 404, pp. 392-394.
17. Sejoong Kim M.D., Kwon Wook Joo M.D. Electrolyte and acid-base disturbances associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Electrolytes Blood Pressure*, 2007, vol. 5, no. 2, pp. 116-125.

18. Black H.E. Renal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Toxicologic pathologic*, 1986, vol. 14, no. 1, pp. 83-90.
19. Park J.H., Park Y.S., Lee J.B., Park K.H., Paik M.K., Jeong M., Koh H.C. Meloxicam inhibits fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. *J. Appl. Toxicol.*, 2016, vol. 36, pp. 10–23.
20. Pawlukianiec C., Gryciuk M.E., Mil K.M., Zendzian-Piotrowska M., Zalewska A., Maciejczyk M.A. New insight into meloxicam: Assessment of antioxidant and anti-glycating activity in in vitro studies. *Pharmaceuticals* (Basel), 2020, vol. 13, no. 9, p. 240.
21. Tasaki Y., Yamamoto J., Omura T., Noda T., Kamiyama N., Yoshida K., Satomi M., Sakaguchi T., Asari M., Ohkubo T., Shimizu K., Matsubara K. Oxicam structure in non-steroidal anti-inflammatory drugs is essential to exhibit Akt-mediated neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cytotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, vol. 676, pp. 57-63.

**NON-STEROID ANTI-INFLAMMATORY DRUG MELOXICAM ATTENUATES THE EFFECT OF  
IMMUNOMODULATOR GLUTOXIM ON Na<sup>+</sup> TRANSPORT  
IN FROG SKIN EPITHELIUM**

**Melnitskaya A.V.<sup>1</sup>, Krutetskaya Z.I.<sup>1</sup>, Antonov V.G.<sup>2</sup>, Krutetskaya N.I.<sup>1</sup>, Badulina V.I.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> St. Petersburg State University

*Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: a.melnitskaya@spbu.ru*

<sup>2</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University

*Litovskaya st., 2, St. Petersburg, 194100, Russia*

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0628

**Abstract.** The article is devoted to the study of redox regulation of transepithelial ion transport in osmoregulatory epithelium. The pharmacological analogue of oxidized glutathione, drug glutoxim®, has antioxidant and radioprotective properties and is widely used as an immunomodulator and cytoprotector in complex therapy of bacterial, viral and oncological diseases. Using voltage-clamp technique, the influence of non-steroidal anti-inflammatory drug meloxicam, an inhibitor of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid oxidation, on glutoxim effect on Na<sup>+</sup> transport in frog *Rana temporaria* skin was investigated. It was shown for the first time that frog skin preincubation with meloxicam significantly reduces the stimulatory effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport. The data obtained indicate the involvement of cyclooxygenase pathway of arachidonic acid oxidation in the effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in frog skin epithelium. The results also contribute to a more detailed understanding of molecular mechanisms of pharmacological effect of glutoxim and meloxicam, and may be useful for their application in clinics.

**Key words:** Na<sup>+</sup> transport, glutoxim, meloxicam, frog skin epithelium.

## ОСОБЕННОСТИ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ ПРИ ОНКОГЕНЕЗЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС

Позднякова М.А., Жукова Е.С.

Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии  
ул. Семашко, 20, г. Нижний Новгород, 603005, РФ; e-mail: evgenya\_plekhanova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0629

**Аннотация.** В работе проверяется гипотеза о зависимости противоопухолевой эффективности фотобиомодуляции (ФБМ) от интенсивности окислительной модификации макромолекул. Об уровне окислительных процессов в организме судили по содержанию в биологических тканях и жидкостях, индуцированных активными формами кислорода (АФК) продуктов модификации липидов, белков, ДНК, а также активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Предлагается использовать поведенческую активность животных в тесте «открытое поле» как неинвазивный показатель для прогнозирования биологических эффектов фотобиомодуляции, косвенно отражающий степень окислительной напряженности в организме. Показано, что уровень поведенческой активности коррелирует с активностью СОД в печени ( $\rho=0,8$ ,  $p < 0,03$  по критерию Спирмена). Среди лабораторных крыс можно выделить животных с пассивным, среднеактивным и высокоактивным типом поведения. Для каждого типа характерны различная выраженность окислительных процессов, динамика роста модельных солидных опухолей и ответ на ФБМ фиолетово-синей и красной области спектра. Внутривнутрибрюшинное воздействие озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 0,16 мкг/кг модулирует противоопухолевый эффект ФБМ. Делается вывод, что эффективность действия ФБМ при онкогенезе зависит от интенсивности окислительных процессов в организме и взаимосвязана с особенностями поведения крыс.

**Ключевые слова:** фотобиомодуляция, солидные модели опухолевого роста, перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, уровень повреждений ДНК, активность антиоксидантных ферментов, поведенческая активность, тест «открытое поле».

Традиционные методы лечения в онкологии (хирургия, лучевая и химиотерапия) в моновариантах практически исчерпали свой ресурс. В настоящее время востребована разработка методов комбинированной и комплексной терапии, направленных на повышение противоопухолевой эффективности воздействия и/или снижение токсических эффектов лечения. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что низкоинтенсивное электромагнитное излучение (ЭМИ) оптического диапазона (фотобиомодуляция) способствует сенсбилизации опухолевой ткани к химио- и радиотерапии [1-3]. Однако применение этого излучения связано с риском интенсификации пролиферации опухолевых клеток, что является серьезным препятствием внедрения данного воздействия в клиническую практику. Условия, при которых происходит стимуляция роста опухолей, остаются не выясненными.

На основе предполагаемых механизмов действия ЭМИ оптического диапазона [4] была выдвинута гипотеза - противоопухолевая эффективность фотобиомодуляции зависит от интенсивности окислительной модификации макромолекул-фотоакцепторов и их молекулярного окружения. Однако на сегодняшний день не выявлены параметры, с помощью которых можно было бы достоверно охарактеризовать выраженность окислительных процессов в организме [5]. Классически для этих целей используется оценка содержания в биологических тканях и жидкостях АФК-индуцированных продуктов модификации липидов, белков, ДНК, а также активности антиоксидантных ферментов. Проведен анализ литературных данных на предмет выявления возможного неинвазивного интегрального показателя, который косвенно отражал бы степень выраженности интенсивности окислительных реакций в организме млекопитающих. Выявлено, что нервная система является одной из наиболее чувствительной к окислительному стрессу [6]. В работе Magimoutou M. с соавторами [7] было показано, что окисление кальмодулина сопровождается изменением уровня ориентировочно-исследовательской активности у мелких лабораторных грызунов в тесте «открытое поле». В локусах, ассоциированных с поведением животных в этом тесте, расположены некоторые гены ферментов антиоксидантной системы защиты (*Sod 1* и *2*, тиоредоксин-подобный белок) [8-9]. Кроме того, в последнее время все больше появляется данных о взаимосвязях поведенческих особенностей лабораторных животных с реактивностью иммунной системы [10], уровнем метаболизма некоторых веществ [11], характером ответа на стрессовые воздействия [12]. Исходя из вышесказанного, поведенческая активность животных в тесте «открытое поле» может быть связана с уровнем окислительных процессов и отражать степень окислительной напряженности в организме, что можно использовать как интегральный неинвазивный показатель для прогнозирования биологических эффектов фотобиомодуляции.

Если выдвинутая гипотеза верна и направление ответа на действие низкоинтенсивного ЭМИ оптического диапазона будет зависеть от фонового уровня окислительных процессов, то искусственное изменение окислительной напряженности в живой системе может модулировать ее отклик на воздействие. В качестве системного модулятора уровня окислительных процессов в организме при опухолевом росте наиболее

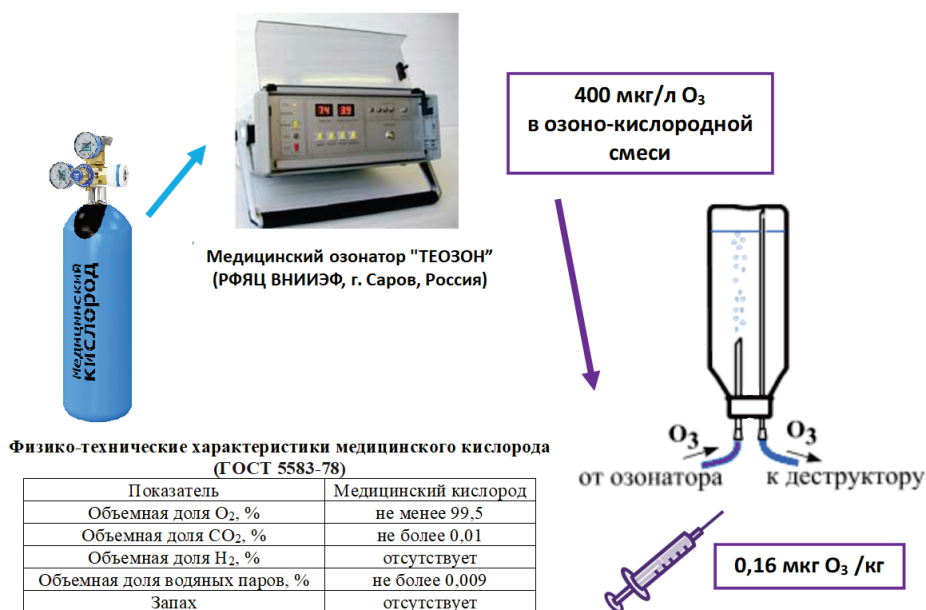


оптимально использовать озон [13-18], а для усиления генерации активных форм кислорода непосредственно в ткани неоплазии - искусственные фотосенсибилизаторы [19].

Целью данного исследования явилась оценка зависимости действия низкоинтенсивного ЭМИ оптического диапазона на развитие солидных опухолей от интенсивности окислительных процессов в организме крыс.

Исследования проведены на 138 ювенильных аутбредных крысах-самцах стока SD. Все манипуляции с животными проводились с соблюдением этических принципов и рекомендаций, установленных Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях. В качестве модели неоплазии использовали два крысинных опухолевых штамма - медленно растущую нематастазирующую холангиоцеллюлярную карциному PC-1 и агрессивнее растущий склонный к метастазированию рак почки РА (РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН), пересаживаемые подкожно. Источники ЭМИ оптического диапазона - экспериментальные генераторы низкоинтенсивного ЭМИ ( $\lambda_1 = 400 \pm 20$  нм, 4,6 Дж/см<sup>2</sup>,  $\lambda_2 = 460 \pm 20$  нм, 3,2 Дж/см<sup>2</sup>, транскутанно 15 минут; ИПФ РАН, Нижний Новгород), и аппарат физиотерапевтический светодиодный АФС для ФДТ ( $\lambda_3 = 660 \pm 10$  нм, транскутанно; ООО «Полироник», Москва). Модификаторы окислительных процессов в организме – озон, получаемый на медицинском озонаторе «ТЕОЗОН» (РФЯЦ ВНИИЭФ, Саров), посредством внутрибрюшинного введения озонированного физиологического раствора (рис. 1), и фотосенсибилизатор гидроксид алюминия трисульфогфталоцианин (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва). Схемы воздействия, дозировки и их обоснование были подробно описаны в наших работах [20-23]. Оценивали поведение крыс в тесте «открытое поле», противоопухолевую эффективность воздействий по параметру Т/С, обратно пропорциональному индексу торможения роста опухоли, и по коэффициенту прироста опухоли, общую свободнорадикальную активность косвенно методом индуцированной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и Fe<sup>2+</sup> хемиллюминесценции, уровень перекисного окисления липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой, степень окислительной модификации белков по уровню карбонильных производных с помощью реакции с 2,4-динитрофенилгидразином, уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс с помощью щелочной версии метода ДНК-комет, активность супероксиддисмутазы по реакции восстановления нитросинего тетразолия и каталазы по скорости разложения пероксида водорода [22-23]. Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica (V.8). Нормальность их распределения оценивали по тесту Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде Me [25%; 75%], где Me – медиана регистрируемого параметра, а 25% и 75% - интерпроцентильный размах. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента-Ньюмена-Кейлса при нормальном распределении данных ( $p < 0.016$ ). При ненормальном распределении использовали в качестве предварительного статистического метода Н-тест Краскела-Уоллиса, с последующим попарным сравнением с помощью критерия Манна-Уитни. В качестве критического уровня значимости использовали  $p < 0.05$  с учетом поправки Бонферони. При распределении подопытных животных по типу поведенческой активности использовали метод k-средних. Оценка корреляционной взаимосвязи осуществлялась по коэффициенту Спирмена.

Показана сильная корреляционная взаимосвязь между уровнем поведенческой активности крыс в тесте «открытое поле» и активностью СОД в печени ( $\rho=0,8$ ,  $p < 0,03$  по критерию Спирмена). По показателям исследовательской и двигательной активности, эмоциональности и тревожности животные разделились по типу



**Рисунок 1.** Схема получения озонированного физиологического раствора и концентрации озона, вводимые внутрибрюшинно животным за одну процедуру

**Таблица 1.** Биохимические параметры окислительного гомеостаза организма крыс во взаимосвязи с уровнем поведенческих реакций животных в тесте «открытое поле»

Исследуемый параметр	Тип поведенческой активности крыс		
	пассивный	среднеактивный	высокоактивный
ОИА	126 [88; 142]*^	175 [161; 186]*	237 [219; 253]
АСР плазмы крови, усл. Ед	2,32 [2,30; 2,35]↑	1,99 [1,92; 2,04]	1,78 [1,75; 1,80]↓
СОД эритроцитов, ед. акт. / г Нв	181 [178; 195]	138 [102; 189]	106 [100; 111]
СОД печени, ед. акт. / г ткани	13 [7; 16]	24 [17; 30]	40 [39; 45]
КАТ печени, ед. акт. / г ткани	0,99 [0,81; 1,05]↑	0,57 [0,49; 0,66]	0,32 [0,25; 0,40]↓
ТБК-АП печени, нмоль/мл	31,9 [28,3; 33,7]	27,6 [24,9; 28,1]	25,2 [22,0; 27,2]

Примечание: ОИА – ориентировочно-исследовательская активность, АСР – общая активность свободнорадикальная, СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ТБК-АП – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; \* -  $p < 0.001$  относительно высокоактивных крыс, ^ -  $p < 0.001$  относительно среднеактивных крыс по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса; ↑ или ↓ - статистически значимые отличия показателей при сравнении значений с животными среднеактивного типа поведения ( $p < 0.025$ , U-критерий Манна-Уитни)

поведения: 1) пассивные 2) среднеактивные и 3) высокоактивные (метод k-средних,  $p < 0,001$ ). По сравнению со среднеактивными для пассивных крыс была характерна более высокая интенсивность окислительных процессов в организме, для высокоактивных наоборот – низкая, данные приведены в таблице 1 [22].

Для животных с пассивным поведением отмечены более высокая скорость пролиферации опухолевых клеток РС-1 в начале логарифмической фазы роста и последующая спонтанная регрессия [22], более агрессивное развитие РА с метастазированием [23]. Воздействие ЭМИ фиолетово-синего диапазона на РС-1 ранних сроков развития у пассивных животных стимулировало опухолевую прогрессию, у среднеактивных – тормозило, у высокоактивных – привело к регрессированию. Предварительное курсовое действие озона изменило отклик на воздействие ЭМИ фиолетово-синего спектра: у пассивных крыс наблюдалась остановка роста с последующим регрессированием опухолевого очага, у среднеактивных – краткосрочное торможение и продолженный рост, у высокоактивных - наблюдался выраженный противоопухолевый эффект [22]. Фотодинамическое воздействие с использованием ЭМИ красного диапазона и фотосенсибилизатора способствовало прогрессии РА у высокоактивных крыс. При этом предварительное курсовое действие озона снижало риски стимулирования пролиферации опухолевых клеток и повышало противоопухолевый эффект [23].

Таким образом, показано, что эффективность действия ЭМИ оптического диапазона при онкогенезе зависит от интенсивности окислительных процессов в организме и взаимосвязана с особенностями поведения крыс.

#### Список литературы / References:

1. Heymann P.G.B., Henkenius K.S.E., Ziebart T., Braun A., Hirshammer K., Halling F., Neff A., Mandic R. Modulation of tumor cell metabolism by laser photochemotherapy with cisplatin or zoledronic acid in vitro. *Anticancer research*, 2018, vol. 38, no. 3, doi: 10.21873/anticancer.12351.
2. de Faria C.M.G., Barrera-Patiño C.P., Santana J.P.P., da Silva de Avó L.R., Bagnato V.S. Tumor radiosensitization by photobiomodulation. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 2021, vol. 225, no. 112349, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112349.
3. Tabosa A.T.L., Souza M.G. et al. Effect of low-level light therapy before radiotherapy in oral squamous cell carcinoma: An in vitro study. *Lasers in medical science*, 2022, vol. 37, no. 9, doi: 10.1007/s10103-022-03632-x.
4. Кару Т.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии. *Лазерная медицина*, 2001, т. 5, № 1 [Karu T.I. Cellular mechanisms of low power laser therapy. *Lazernaya medicina*, 2001, vol. 5, no. 1 (In Russ.)].
5. Marrocco I., Altieri F., Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, vol. 2017, doi: 10.1155/2017/6501046.
6. Peers C., Boyle J.P. Oxidative modulation of K<sup>+</sup> channels in the central nervous system in neurodegenerative diseases and aging. *Antioxid Redox Signal*, 2015, vol. 22, no. 6, doi: 10.1089/ars.2014.6007.
7. Marimoutou M., Springer D.A., Liu C., Kim G., Levine R. L. Oxidation of methionine 77 in calmodulin alters mouse growth and behavior. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2018, vol. 7, no. 10, doi: 10.3390/antiox7100140.
8. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Markel A.L. Genetic control of the behavior of ISIAH rats in the open field test. *Russian Journal of Genetics*, 2022, vol. 58, no. 7, doi: 10.1134/S1022795422070146.
9. Vedi M., Smith J.R. et al. 2022 updates to the Rat Genome Database: a Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable (FAIR) resource. *Genetics*, 2023, vol. 224, no. 1, doi: 10.1093/genetics/iyad042.
10. Маркова Е.В. *Поведение и иммунитет*. Новосибирск: Новосибирский государственный педагогический университет, 2013, 165 с. [Markova E.V. *Behavior and immunity*. Novosibirsk: Novosibirskij gosudarstvennyj pedagogicheskij universitet, 2013, 165 p. (In Russ.)].
11. Иванов Д.Г., Подковкин В.Г. Взаимосвязь уровня метаболизма коллагена и поведения крыс в тесте "открытое поле". *Успехи современного естествознания*, 2010, № 5 [Ivanov D.G., Podkovkin V.G. Relationship between the level of collagen metabolism and the behavior of rats in the "open field" test. *Uspexi sovremennogo estestvoznaniya*, 2010, no. 5 (In Russ.)].

12. Pertsov S.S., Abramova A.Y., Chekhlov V.V. Effect of repeated stress exposures on the blood cytokine profile in rats with different behavioral parameters. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2022, vol. 172, no. 4, doi: 10.1007/s10517-022-05401-w.
13. Перетягин С.П., Мартусевич А.К., Ванин А.Ф. Молекулярно-клеточные механизмы трансформации гомеостаза биосистем активными формами кислорода и азота. *Медицинский альманах*, 2013, № 3, вып. 27 [Peretyagin S.P., Martusevich A.K., Vanin A.F. Molecular and cellular mechanisms of transformation of homeostasis of biosystems by active forms of oxygen and nitrogen. *Medicinskij al'manah*, 2013, no. 3, iss. 27 (In Russ.)].
14. Щербатюк Т.Г. Озонотерапия злокачественных новообразований: за и против. *Нижегородский медицинский журнал*, 2003, № 1 [Shcherbatyuk T.G. Ozone therapy for malignant neoplasms: pro and con. *Medicinskij al'manah*, 2003, no. 1 (In Russ.)].
15. Naumov A.A., Potselueva M.M. Influence of nitric oxide donor, NO-synthase substrate, and inhibitor on leucocyte ROS-generating activity during ascites tumor growth. *Cell and Tissue Biology*, 2011, vol. 5, no. 1, doi: 10.1134/S1990519X1101010X.
16. Bocci V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects. *Free Radic Res.*, 2012, vol. 46, no. 9, doi: 10.3109/10715762.2012.693609.
17. Sharapov M.G., Novoselov V.I. Catalytic and signaling role of peroxiredoxins in carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 2019, vol. 84, no. 2, doi: 10.1134/S0006297919020019.
18. Baeza-Noci J., Pinto-Bonilla R. Systemic review: ozone: a potential new chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 21, doi: 10.3390/ijms222111796.
19. Uzdensky A.B. The biophysical aspects of photodynamic therapy. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 3, doi: 10.1134/S0006350916030192.
20. Gapeyev A.B., Zhukova E.S., Sinelnikova V.A., Balakin G.Yu., Zemskova M.Yu., Rystsov G.K., Shcherbatyuk T.G. Comparative study of DNA damage in mouse blood leukocytes and MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells induced by various concentrations of ozone, hydrogen peroxide, and gemcitabine. *Biophysics*, 2022, vol. 67, no. 3, doi: 10.1134/s0006350922030058.
21. Жукова Е.С., Кашина А.Ю., Иркаева А.М. Современные аспекты лечения профессиональной онкопатологии: перспективы применения медицинского озона для коррекции свободнорадикального гомеостаза. *Медицина труда и промышленная экология*, 2020, т. 60, № 11, doi: 10.31089/1026-9428-2020-60-11-767-770 [Zhukova E.S., Kashina A.Yu., Irkaeva A.M. Modern aspects of professional cancer treatment: prospects for the use of medical ozone in the correction of free radical homeostasis. *Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology*, 2020, vol. 60, no. 11 (In Russ.)].
22. Zhukova E.S., Shcherbatyuk T.G., Chernigina I.A., Chernov V.V., Gapeyev A.B. Violet-blue light photobiomodulation of the dynamics of tumor growth and prooxidant-antioxidant balance in the body of tumor carriers. *Biophysics*, 2022, vol. 67, no. 3, doi: 10.1134/s0006350922030241.
23. Shcherbatyuk T.G., Zhukova Plekhanova E.S., Nikitina J.V., Gapeyev A.B. Oxidative modification of proteins in the tissues of rats with growing tumors under the ozone-photodynamic treatment. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 2, doi: 10.1134/S0006350920020219.

## FEATURES OF PHOTOBIMODULATION DURING ONCOGENESIS DEPENDING ON THE INTENSITY OF OXIDATIVE PROCESSES IN THE ORGANISM OF RATS

Pozdnyakova M.A., Zhukova E.S.

Nizhny Novgorod Scientific Research Institute for Hygiene and Occupational Pathology  
Semashko str., 20, Nizhny Novgorod, 603005, Russia; e-mail: evgenya\_plekhanova@mail.ru

Received 21.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0629

**Abstract.** In work tested the hypothesis that the antitumor efficacy of photobiomodulation (PBM) depends on the intensity of oxidative modification of macromolecules. The level of oxidative processes in the body was judged by the content of ROS-induced products of lipid, protein, and DNA modification, as well as the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase in biological tissues and fluids. It is proposed to use the behavioral activity of animals in the "open field" test as a non-invasive indicator for predicting the biological effects of photobiomodulation, indirectly reflecting the degree of oxidative stress in the body. It was shown that the level of behavioral activity correlates with SOD activity in the liver ( $\rho=0.8$ ,  $p < 0.03$ , Spearman's test). Among laboratory rats, animals with passive, moderately active and highly active types of behavior can be distinguished. Each type is characterized by different severity of oxidative processes, growth dynamics of model solid tumors, and response to PBM in the violet-blue and red regions of the spectrum. Intraperitoneal exposure to ozonized saline with an ozone concentration of 0.16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  modulates the antitumor effect of PBM. It is concluded that the effectiveness of PMB during oncogenesis depends on the intensity of oxidative processes in the body and is interrelated with the behavioral characteristics of rats.

**Key words:** photobiomodulation, solid models of tumor growth, lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, level of DNA damage, activity of antioxidant enzymes, behavioral activity, open field test.

## COMPARISON OF MELATONIN PHOTODEGRADATION BETWEEN SUNLIGHT AND UV IRRADIATION

**Barrera Quiroz R.A., Hernandez Santiago A.A., Zenteno Mateo B.,  
Gonzalez Fuentes M.A., Mendez Albores A., Mendez Albores E.**

Meritorious Autonomous University of Puebla

Ciudad Universitaria CU, San Claudio S/N. C.P 72570, Puebla, Pue., México; e-mail: erika.mendez@correo.buap.mx

Received 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2023.0630

**Abstract.** Melatonin is synthesized mainly in the pineal gland, retina, digestive tract, and skin. This hormone is widely prescribed for therapeutic applications such as treating circadian rhythm, intercontinental flight dysrhythmia (jet lag syndrome), and sleep disorders. As a result of the COVID-19 pandemic, the consumption of this hormone was increased up to 300% in doses higher than 5 mg day because it was used to treat insomnia and as an adjunct to treat SARS-CoV-2. Therefore, this hormone is expected to be present in surface water bodies as a pollutant. Although it is reported that melatonin can be photolabile, its photochemistry has not been exhaustively studied. For this reason, the photodegradation of melatonin in solution was evaluated in this work. Solutions of 20 and 500  $\mu\text{M}$  of melatonin dissolved in water were exposed to sunlight and UVA irradiation, and the degradation was monitored by spectrophotometry and total organic carbon.

**Key words:** melatonin, photodegradation, spectrophotometry, adjunct to treat SARS-CoV-2.

### INTRODUCTION

The 2030 Agenda for Sustainable Development was ratified by the United Nations Organization member states in 2015. The 2030 Agenda is a plan of action for people, the environment, and prosperity. This Agenda has 17 Sustainable Development Goals (SDGs) and lays out a strategy for achieving these goals over 15 years. Goal six of the 2030 Agenda consists of "clean water and sanitation," as the United Nations Organization reports that in 2015, 4,5 billion people lacked safely managed sanitation services, and 2,3 billion lacked even basic sanitation. Therefore, it is necessary to develop viable protocols to remove pollutants present in water, including emerging pollutants. Emerging pollutants (EC) are characterized by little or no monitoring and regulation at the national or international level because they are substances for which there is a lack of information on their occurrence, concentration, and risk to health [1]. Pharmaceuticals are one class of this type of pollutant that is of particular concern because they are introduced into water bodies mainly through the discharge of wastewater and effluent, as well as direct emissions from production sites and improper disposal of excess pharmaceuticals in households. As a result, pharmaceuticals are often not completely removed in wastewater treatment plants and are released into receiving waters [2].

Melatonin (MLT), a neuroendocrine hormone that controls the circadian cycle and is used to treat insomnia [3], has seen a surge in use both before and during the COVID-19 pandemic because of the sleep problems caused by the alarming scenario unfolding around the world. In addition, MLT has been suggested as an adjuvant in the treatment of COVID-19 in its many stages, as a prophylactic measure, as therapy in intensive care units, and to enhance the effectiveness of vaccinations [4]. MLT is available in tablets and capsules for human consumption and is sold without a prescription in many countries, even over the counter in health food stores [5].

As a result, Li et al. (2022) [6] reported an increase in the use of MLT of up to 300% (comparing the years 1999 and 2018), even at doses higher than 5 mg day [1]; the increase in use was 28% in the US adult population. About the child population, which was at home as a means of protection during the pandemic, it was reported that there was an increase in accidental ingestion of MLT, causing the death of two children under two years of age and requiring mechanical ventilation in the other five cases. In Ontario, Canada, melatonin supplements that contain up to 478% more melatonin than stated on the label are marketed. 26% of those products contain serotonin, a product of MLT dysfunction, in clinically significant doses, as it is a controlled medication prescribed to maintain emotional balance and combat depression [7].

Although the consumption of melatonin is considered safe, adverse effects such as headache, insomnia, rash, stomach upset, and nightmares have been reported. However, other authors report that 150 to 450 ngL<sup>-1</sup> of MLT consumption can suppress testosterone production, decrease semen quality, and affect sexual activity and reproduction in animals and humans [8,9].

Therefore, there is a great need to search for methods to treat and remove this pollutant. One alternative is represented by photolysis, a chemical process that breaks chemical bonds because of the transfer of light energy (direct photolysis) or radiation energy (indirect photolysis) to these bonds [10].

Therefore, in this work, the evaluation of the photodegradation of melatonin using sunlight and a 365 nm UV lamp is reported.

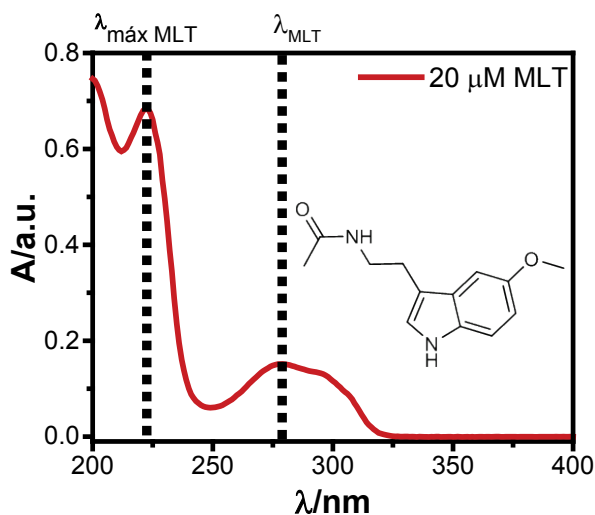


Figure 1. UV-Vis spectra of MLT 20  $\mu\text{M}$  in aqueous medium

### METHODOLOGY

Melatonin (CAS: 73-31-4) and pure ethyl alcohol (CAS: 64-17-5) were purchased from Sigma Aldrich. Solutions of melatonin were prepared with deionized water, and the minimum amount of pure ethyl alcohol was required to solubilize melatonin. In this case, 20 and 500  $\mu\text{M}$  of melatonin solutions were evaluated in photolysis experiments by sunlight and ultraviolet (365 nm = UVA) irradiation.

For the sunlight-irradiated solutions, 40 mL of each MLT concentration was placed in a glass bottle to reach the sunlight. Each solution was monitored by UV-Vis spectrophotometry (CARY 50BIO UV-Visible Spectrophotometer) at different exposure times, and the total organic carbon (Total Organic Carbon Analyzer Shimadzu TOC-LCSN) allowed to monitor the percentage of mineralization of the sample.

On the other hand, the lamp used during ultraviolet irradiation was a UVP Blak-Ray XX-15BLB (15 watts-365 nm (UVA)), using 8 mL of each MLT solution (20 or 500  $\mu\text{M}$ ). In this case, these samples were placed in beakers and they were mechanically stirred during the experiment. As with the sunlight-exposed samples, these samples were monitored by UV-Vis spectrophotometry and total organic carbon analysis.

### RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the characteristic spectrum of a 20 M MLT solution in an aqueous medium. It can be observed that MLT has two bands, one at  $\lambda_{\text{max}}=222$  nm and the other at  $\lambda=278$  nm.

**Photolysis by sunlight irradiation.** In the UV-Vis spectra shown in Figure 2a and Figure 2b it is possible to observe the gradual shift of the  $\lambda_{\text{max}}$  of the MLT, located at 222 nm, towards 232 nm. For the absorption band  $\lambda=278$  nm, the observed shift is towards 269 nm, and it is also possible to observe an absorption band in the range of 300 to 350 nm, whose intensity value increases with the hours of exposure to sunlight. Furthermore, in these figures, isosbestic points at 272 and 310 nm can be observed, which indicates the formation of melatonin oxidation products [11]. This behavior becomes even more obvious when looking at Figure 2c and Figure 2d, which show the comparison of the UV-Vis spectra of MLT solutions c) 20  $\mu\text{M}$  and d) 500  $\mu\text{M}$  before (red curve) and after 125 h (blue curve) of exposure to sunlight.

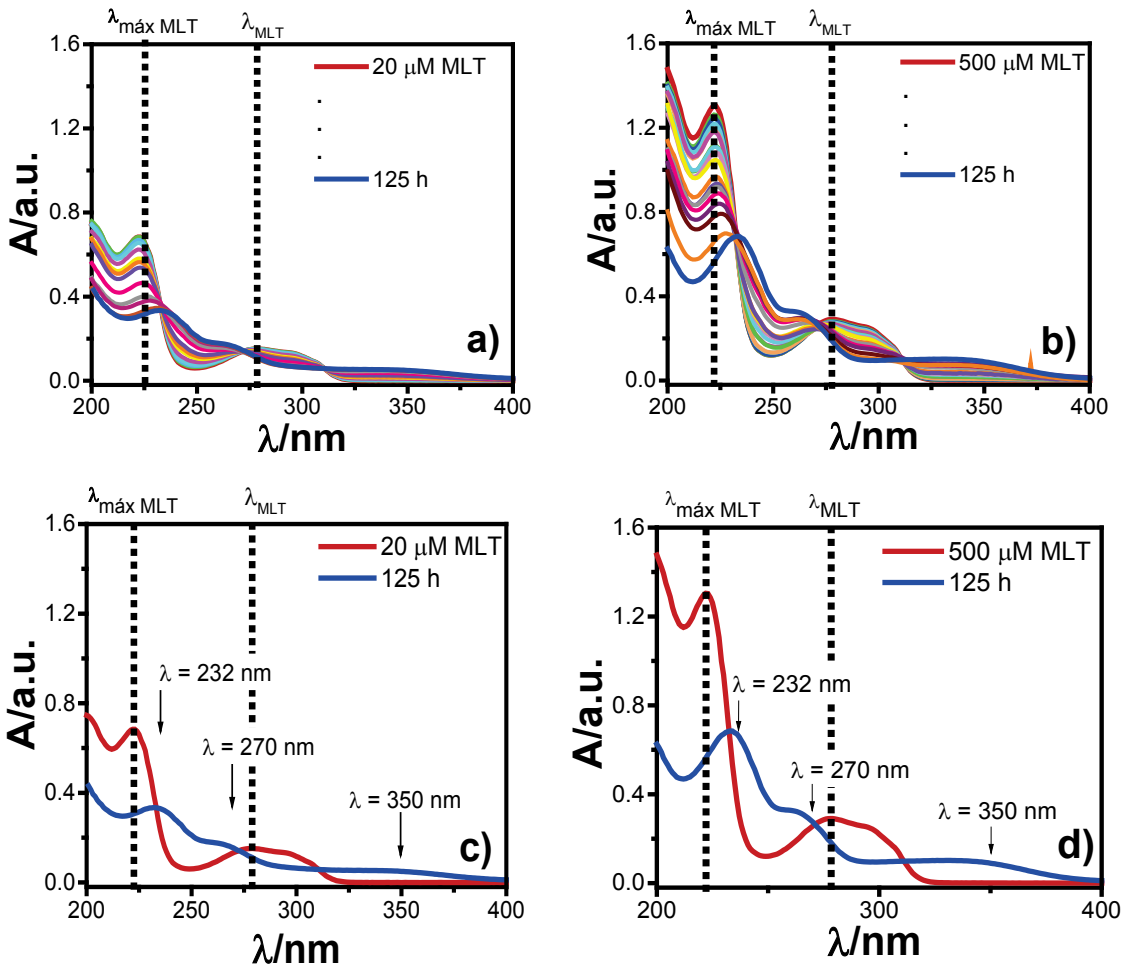
According to [12], Figure 3 shows the possible photodegradation pathway of MLT when exposed to sunlight.

Regarding total organic carbon analysis, the percentage of mineralization obtained was ~44% for both solutions.

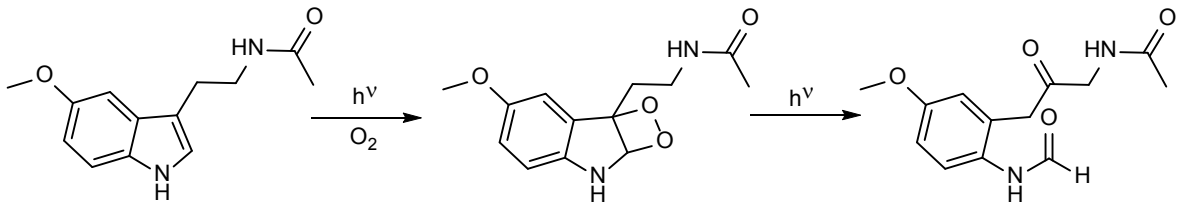
**Photolysis by UV irradiation.** In the UV-Vis spectra shown in Figure 4a and Figure 4b, it is possible to observe that the  $\lambda_{\text{max}}$  of the MLT, located at 222 nm, does not undergo any change when the solution evaluated is 20  $\mu\text{M}$  MLT, contrary to the case of 500  $\mu\text{M}$  MLT solution, where a slight decrease in absorbance is observed.

In both solutions, it is possible to observe the formation of new absorption bands at 270 and 350 nm, indicating the presence of degradation products, and these bands are consistent with those observed in the degradation of melatonin by sunlight.

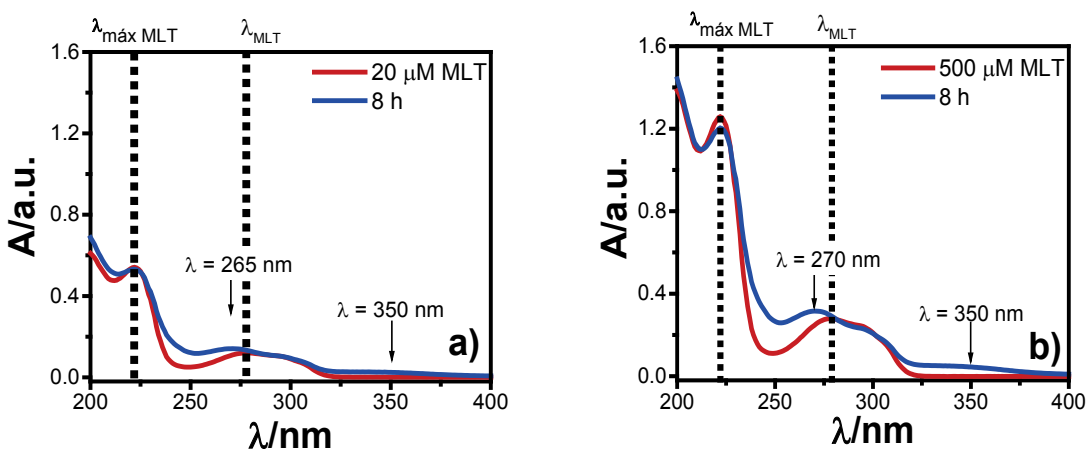
Figure 5 shows the change in the total organic carbon normalized to the initial value with respect to the UV irradiation exposure for the two solution concentrations of MLT evaluated. After 8 hours of treatment, the percentage of mineralization was 75% for the 20  $\mu\text{M}$  of MLT solution, while in the case of the 500  $\mu\text{M}$  solution, the removal percentage was 66%.



**Figure 2.** UV-Vis spectra of MLT a) 20 M and b) 500 M concentrations at different times of sunlight exposure. Comparison of UV-Vis spectra of MLT c) 20 M and d) 500 M concentrations before (red curve) and after 125 h of sunlight exposure (blue curve)



**Figure 3.** Melatonin degradation photoproduct, according to [12].



**Figure 4.** Comparison of UV-Vis spectra of MLT a) 20 M and b) 500 M concentration, irradiated with UV light (365 nm) during 480 min

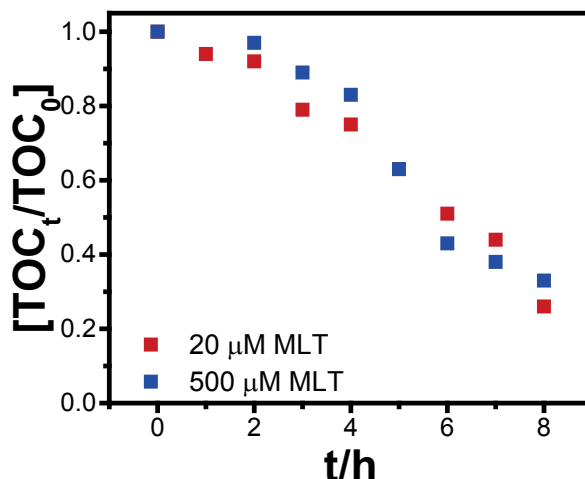


Figure 5. [TOC<sub>t</sub>/TOC<sub>0</sub>] vs. UV irradiation time exposure of 20 μM and 500 μM of MLT concentration

## CONCLUSIONS

UV-Vis spectrophotometry and TOC techniques were used to analyze the degradation of 20 μM and 500 μM of MLT exposed to sunlight and UV irradiation. It was observed that two absorption bands were formed at 270 nm and 350 nm as a result of MLT photodegradation, being more visible during sunlight irradiation. However, TOC analysis only showed 44% of mineralization abatement in both MLT concentrations at the end of 125 h of sunlight irradiation. On the other hand, the TOC abatement using UV irradiation showed a decrease of ~70% in both MLT concentrations only in 8 h of exposure. These results suggest that UVA is more effective in photodegrading MLT in water than sunlight irradiation. However, it is necessary to analyze the subproducts using chromatography techniques.

### References:

1. Bell K.Y., Wells M.J.M., Traexler K.A., Pellegrin M.-L., Morse A., Bandy J. Emerging Pollutants. *Water Environ Res.*, 2011, vol. 83, no.10, pp. 1906-1984.
2. Carballa M., Omil F., Lema J.M., Garc C., Rodr I. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.*, 2004, vol. 38, pp. 2918-2926.
3. Macchi M.M., Bruce J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 2004, vol. 25, no. 3-4, pp. 177-195.
4. Wichniak A., Kania A., Sieminski M., Cubala W.J. Review Melatonin as a Potential Adjuvant Treatment for COVID-19 beyond Sleep Disorders. *Int J Mol Sci.*, 2021, vol. 22, pp. 1-14.
5. Ball A.T., Patel B.A. Rapid voltammetric monitoring of melatonin in the presence of tablet excipients. *Electrochim Acta*, 2012, vol. 83, pp. 196-201.
6. Li J., Somers V.K., Xu H., Lopez-Jimenez F., Covassin N. Trends in Use of Melatonin Supplements Among US Adults 1999-2018. 2022, vol. 327, no. 5, pp. 483-485.
7. Kuehn B.M. News From the Centers for Disease Control and Prevention. *J Am Med Assoc.*, 2022, vol. 328, no. 2, p. 123.
8. Luboshitzky R., Shen-Orr Z., Nave R., Lavi S., Lavie P. Melatonin Administration Alters Semen Quality in Healthy Men. *J Androl.*, 2002, vol. 23, no. 4, pp. 572-578.
9. Yilmaz B., Kutlu S., Mogulkuc R. et al. Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. *Neuroendocr Lett.*, 2000, vol. 21, no. 4, pp. 301-306.
10. Speight J.G. Chemical Transformations in the Environment. In: *Environmental Organic Chemistry for Engineers*, 2017, pp. 305-350.
11. Daescu M., Toulbe N., Baibarac M., Mogos A., Lórinzi A., Logofatu C. Photoluminescence as a Complementary Tool for UV-VIS Spectroscopy to Highlight the Photodegradation of Drugs: A Case Study on Melatonin. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 3820, pp. 1-15.
12. Andrisano V., Bertucci C., Battaglia A., Cavrini V. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J Pharm Biomed Anal.*, 2000, vol. 23, pp. 15-23.

**СРАВНЕНИЕ ФОТОДЕГРАДАЦИИ МЕЛАТОНИНА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ СОЛНЕЧНОГО СВЕТА И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

**Баррера Кирос Р.А., Эрнандес Сантьяго А.А., Зентено Матео Б.,  
Гонсалес Фуэнтес М.А., Мендес Альборес А., Мендес Альборес Э.**

Автономный университет Пуэбла

г. Пуэбла, Мексика; e-mail: erika.mendez@correo.buap.mx

Поступила в редакцию 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0630

**Аннотация.** Мелатонин синтезируется главным образом в шишковидной железе, сетчатке, пищеварительном тракте и коже. Этот гормон широко назначают в терапевтических целях, таких как лечение циркадных ритмов, аритмии при межконтинентальных перелетах (синдром смены часовых поясов) и нарушений сна. В результате пандемии COVID-19 потребление этого гормона было увеличено до 300% в дозах выше 5 мг в день, поскольку его использовали для лечения бессонницы и в качестве вспомогательного средства при лечении SARS-CoV-2. Таким образом, ожидается, что этот гормон будет присутствовать в поверхностных водоемах в качестве загрязнителя. Хотя сообщается, что мелатонин может быть фотолабилен, его фотохимия до конца не изучена. По этой причине в данной работе оценивалась фотодеградация мелатонина в растворе. Растворы мелатонина с концентрацией 20 и 500 мкМ, растворенные в воде, подвергали воздействию солнечного света и ультрафиолетового излучения, а деградацию контролировали с помощью спектрофотометрии и общего органического углерода.

**Ключевые слова:** мелатонин, фотодеградация, спектрофотометрия, средство лечения SARS-CoV-2.



## РЕГУЛЯЦИЯ РЕДОКС-ЗАВИСИМОГО МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г.

Белорусский государственный университет

ул. Бобруйская, 5, г. Минск, Республика Беларусь; e-mail: voynarovskiy197@mail.ru

Поступила в редакцию 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0631

**Аннотация.** В представленной работе проведен анализ редокс-активности наночастиц диоксида церия (НДЦ) различных размеров и исследована их способность регулировать адаптационные механизмы эритроцитов в присутствии пероксида водорода. Наночастицы диоксида церия различных размеров синтезировали методом гомогенного осаждения в присутствии гексаметилентетрамина при температуре 60°C и различном времени синтеза. Редокс-свойства наночастиц диоксида церия оценивали спектрофлуориметрически на основе изменения скорости окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина пероксидом водорода. Показано, что из трех исследуемых размеров наибольшей стабильностью и агрегационной устойчивостью обладают наиболее крупные наночастицы. Методом электронной сканирующей микроскопии установлено, что данные наночастицы имеют преимущественно сферическую форму средним диаметром 50 нм и не содержат примесных атомов. В результате исследований в бесклеточных растворах обнаружено, что НДЦ проявляют антиоксидантные свойства и снижают скорость окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина пероксидом водорода. Предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода при концентрации 100–300 мкМ позволяет снизить долю гемолизированных клеток при разрушении нитратом серебра. Применение наночастиц диоксида церия приводит к потенцированию защитного эффекта и сдвигу области гормезиса в сторону меньших концентраций пероксида водорода.

**Ключевые слова:** Наночастицы диоксида церия, эритроциты, пероксид водорода, адаптация.

### ВВЕДЕНИЕ

Основными участниками адаптационных механизмов клеток при патологии являются активные формы кислорода (АФК), которые выполняют роль сигнальных посредников при действии стрессовых факторов на организм. Ключевой молекулой группы АФК, осуществляющей передачу внутриклеточных регуляторных сигналов, является пероксид водорода, характеризующийся наибольшим временем жизни [1,2]. Сигналы, передаваемые пероксидом водорода, характеризуются своим концентрационным порогом активации и длительностью. В малых концентрациях пероксид водорода активирует компенсаторно-адаптационные механизмы, повышающие защитную способность клетки. При окислительном стрессе, когда пероксид водорода продуцируется в больших концентрациях, происходит повреждение биомолекул.

В качестве перспективных регуляторов биологических редокс-зависимых механизмов активно исследуются полупроводниковые наночастицы диоксида церия. Механизм действия НДЦ подобен механизму функционирования супероксиддисмутазы и каталазы и базируется на способности полупроводников обмениваться электронами с адсорбированными на их поверхности молекулами [3]. Ранее нами было показано, что пероксид водорода повышает структурную устойчивость эритроцитов при гемолизе наночастицами и нитратом серебра [4]. В настоящей работе исследовано влияние НДЦ на регуляцию адаптационных процессов эритроцитов пероксидом водорода.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали гексагидрат нитрата церия  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Across organics, США), пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  (РУП Белмедпрепараты, Республика Беларусь), 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (Sigma Aldrich), нитрат серебра  $\text{AgNO}_3$  (ЛенРеактив, Россия). Кровь здоровых доноров получали в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Эритроциты выделяли путём центрифугирования при 1500 об/мин в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) содержащем 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2,7 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ D-глюкозы (рН 7,4).

Наночастицы диоксида церия синтезировали методом гомогенного осаждения из раствора нитрата церия (III) с применением гексаметилентетрамина (ГМТА) [5]. Данный метод позволяет получать наночастицы диоксида церия с контролируемым размером и шириной запрещенной зоны. В работе использовали наночастицы трех различных размеров (I, II и III). Для получения наночастиц разных размеров к 10 мМ раствору нитрата церия добавляли ГМТА в концентрации 30 мМ (I), 100 мМ (II) и 400 мМ (III) и инкубировали в течение соответственно 280, 60 и 20 минут при температуре 60°C. Окончание синтеза регистрировали по появлению пика поглощения на длине волны 250 – 300 нм, соответствующего электронному переходу между валентной зоной и зоной проводимости полупроводника [6]. Количественные изменения наночастиц в экспериментах выражали через концентрацию церия, необходимую для их синтеза. Полученные частицы стабилизировали цитратом натрия при

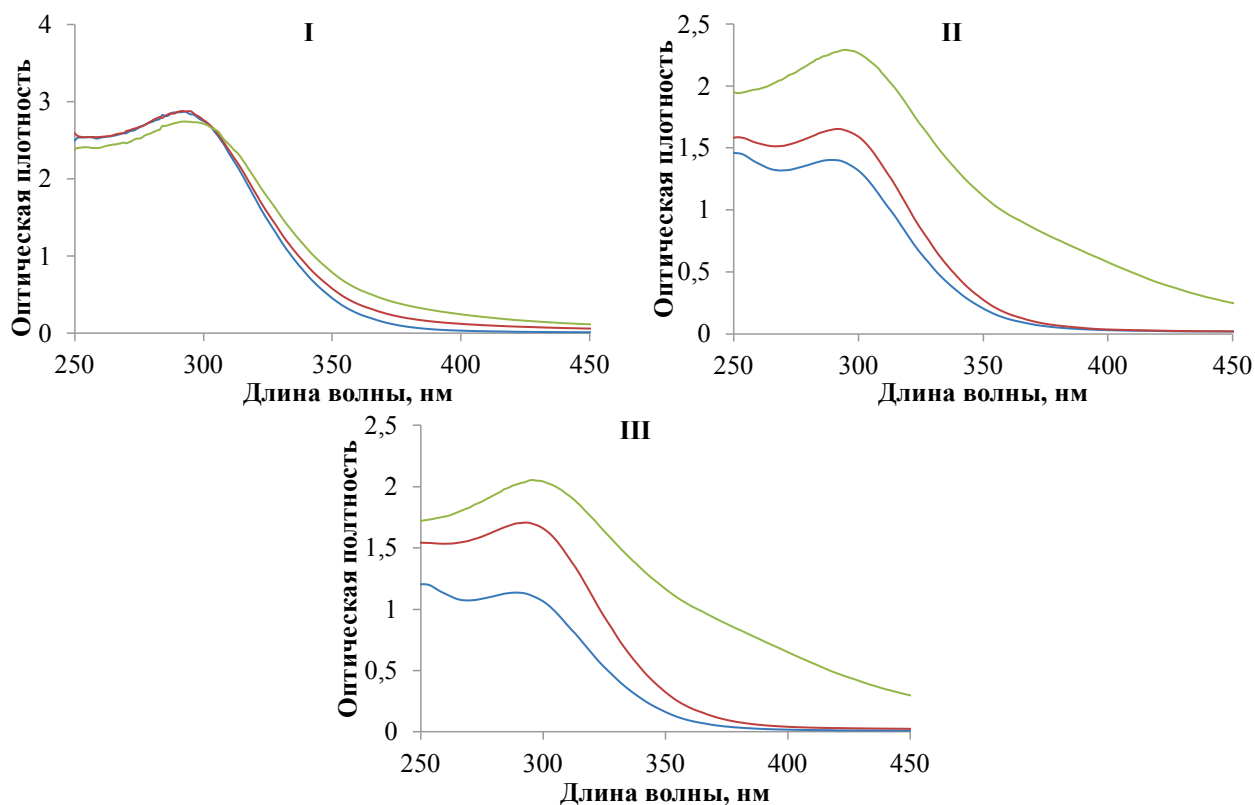
концентрации 10 мМ. Размеры наночастиц определяли с применением сканирующего электронного микроскопа LEO-1455 VP (Oxford Instruments, Германия). Оценка способности наночастиц катализировать разрушение пероксида водорода проводили на основе анализа изменения скорости окисления флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина ( $H_2DCF$ ). Измерение интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF), образующегося при окислении  $H_2DCF$ , проводили при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 530 нм.

Гемолиз инициировали путем добавления нитрата серебра к суспензии эритроцитов. Кинетику гемолиза эритроцитов измеряли путем регистрации оптической плотности клеточной суспензии (30 млн./мл) на длине волны 680 нм при температуре 37°C. По окончании гемолиза, через 20 минут, измеряли спектры поглощения гемолизата. Изменение количества клеток оценивали по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов на длине волны 680 нм. Для определения защитного эффекта клетки инкубировались с пероксидом водорода в течение 10 мин до введения гемолизирующего фактора. Защитный эффект определяли по уменьшению доли негемолизированных эритроцитов ( $N/N_0$ ; где  $N_0$  – начальное количество эритроцитов в суспензии,  $N$  – количество клеток после гемолиза) в присутствии окислителя. Результаты представлены как средние значения плюс–минус стандартное отклонение среднего для трёх–пяти независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью t-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований показано, что наночастицы (I), по сравнению с наночастицами (II) и (III), обладают наибольшей стабильностью. Спектры поглощения наночастиц (I) после синтеза и спустя 24 часа не различаются (рис. 1). Для наночастиц (II) и (III) после взаимодействия с пероксидом водорода наблюдается смещение спектра поглощения в сторону больших длин волн, что говорит об изменении внутренней электронной структуры. Увеличение доли трёхвалентных атомов церия внутренней структуры НДЦ может приводить к уменьшению ширины запрещённой зоны, что снижает энергию необходимую для перехода электрона в зону проводимости и изменяет спектр поглощения [7].

Методом электронной сканирующей микроскопии установлено, что наночастицы (I) имеют преимущественно сферическую форму средним диаметром 50 нм (рис. 2а), наночастицы (II) и (III) имеют меньшие размеры. На основе энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии показано, что НДЦ не содержат примесных атомов. На рисунке 2б представлен рентгеновский спектр выделенной области, содержащей наночастицы, и доля содержащихся в области атомов церия и кислорода в зависимости от положения.



**Рисунок 1.** Спектры поглощения раствора наночастиц I, II и III: после синтеза (синий), спустя 24 часа (красный), после взаимодействия с пероксидом водорода (зелёный)

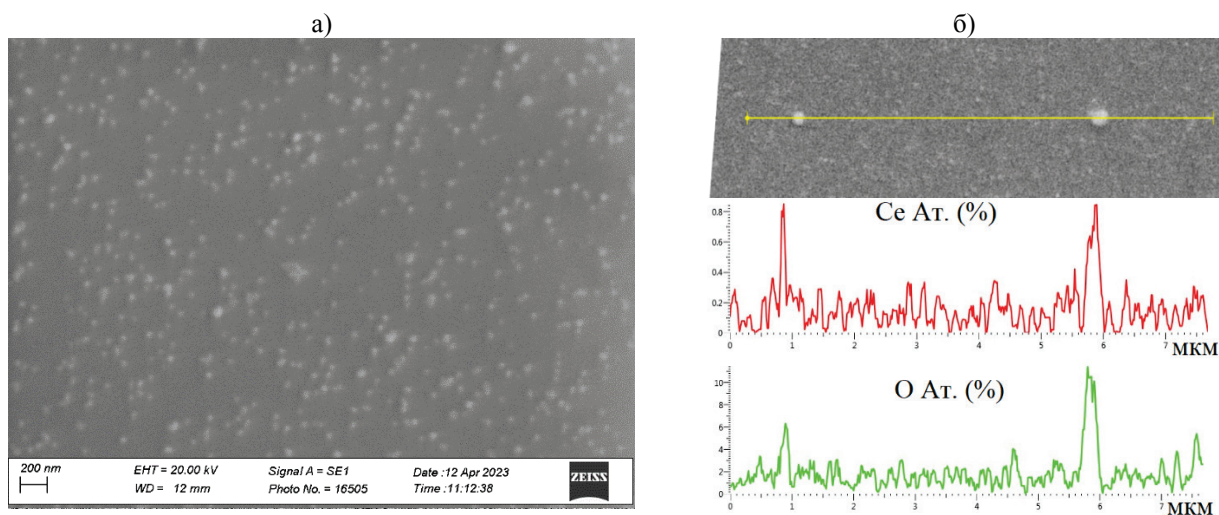


Рисунок 2. Изображение НДЦ (I), полученное методом сканирующей электронной микроскопии (а), и энергия эмиссии рентгеновского спектра соответствующего атомам церия и кислорода вдоль выделенной линии (б)

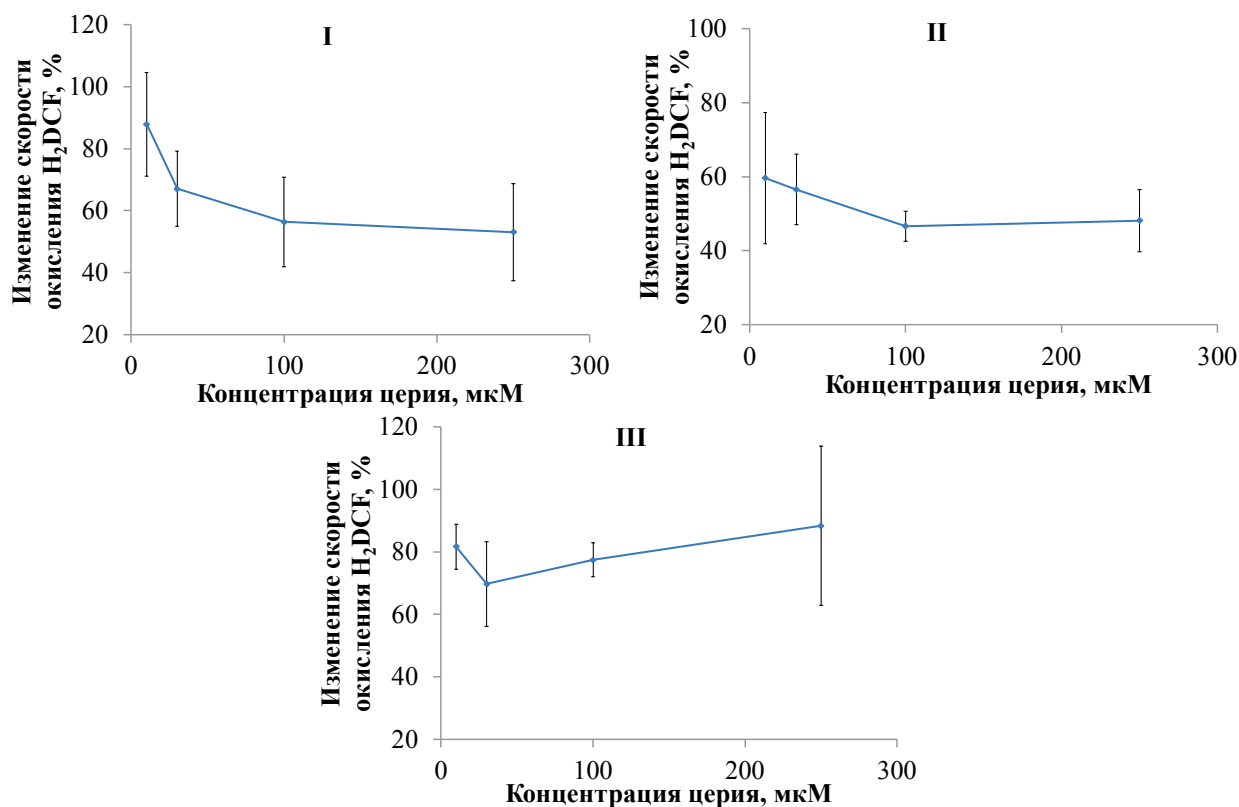
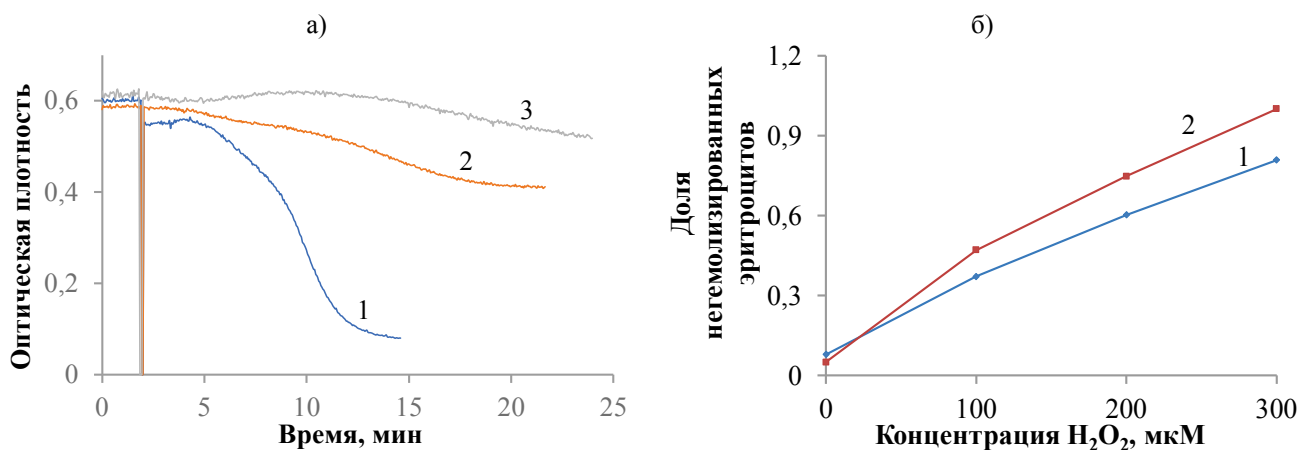


Рисунок 3. Зависимость изменения скорости окисления H<sub>2</sub>DCF пероксидом водорода от концентрации церия

Редокс-свойства наночастиц диоксида церия оценены на основе изменения скорости окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H<sub>2</sub>DCF) пероксидом водорода в бесклеточных растворах. В результате исследований обнаружено, что НДЦ проявляют антиоксидантные свойства и снижают скорость окисления H<sub>2</sub>DCF. На рисунке 3 представлены зависимости изменений скоростей окисления зонда в присутствии наночастиц (I), (II) и (III) от концентрации диоксида церия. Наибольшей способностью при разрушении пероксида водорода обладают наночастицы (I) и (II), для которых величина скорости окисления зонда снижалась на 50% от скорости в отсутствие НДЦ при концентрации церия 100 мкМ. Для наночастиц (III) скорость окисления зонда уменьшалась на 30% от исходной при той же концентрации церия.

В экспериментах с эритроцитами НДЦ не изменяли скорости гемолиза клеток, индуцированного нитратом серебра. С другой стороны, предварительное инкубирование клеток с пероксидом водорода приводило к снижению доли гемолизированных клеток. На рисунке 4а представлены кинетики гемолиза эритроцитов нитратом серебра при предварительном инкубировании с пероксидом водорода (300 мкМ) и наночастицами (I).



**Рисунок 4.** Кинетические кривые гемолiza эритроцитов нитратом серебра при предварительном инкубировании с пероксидом водорода и наночастицами (1) (1 – контроль, 2 – 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 – 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 5 мкМ НДЦ) и зависимости изменения доли негемолизированных клеток при различной концентрации пероксида водорода без НДЦ и в присутствии наночастиц (1 – контроль, 2 – в присутствии НДЦ) (б)

На рисунке 4б показаны зависимости изменения доли негемолизированных клеток при различной концентрации пероксида водорода без НДЦ и в присутствии наночастиц. Как видно из представленных данных применение НДЦ приводит к потенцированию защитного эффекта и сдвигу области гормезиса в сторону меньших концентраций пероксида водорода.

Ранее нами было показано, что обратимое связывание метгемоглобина с мембраной является адаптивным механизмом, направленным на стабилизацию эритроцитарной мембраны при действии пероксида водорода [8]. Вероятно, в результате действия НДЦ изменяется метаболизм пероксида водорода и количество метгемоглобина доступного для связывания с мембраной, что и обуславливает смещение области гормезиса при действии пероксида водорода.

#### Список литературы / References:

1. Мартинович Г.Г. *Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы*. Минск: БГУ, 2021, 239 с. [Martinovich G.G. *Reactive oxygen species in the regulation of cell functions and properties: phenomena and mechanisms*. Minsk: BSU, 2021, 239 p. (In Russ.).]
2. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, vol. 21, no. 3, pp. 1-21, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
3. Huang Y., Jinsong R., Xiaogang Q. Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications. *Chem Rev*, 2019, vol. 119, no. 6, pp. 4357-4412, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00672.
4. Voinarovski V.V., Martinovich G.G. Protective effect of hydrogen peroxide during erythrocyte hemolysis by silver nanoparticles. *Biophysics*, 2022, vol. 67, no. 5, pp. 734-743, doi: 10.1134/S0006350922050220.
5. Щербаков А.Б., Иванова О.С., Спивак Н.Я., Козик В.В., Иванов В.К. *Синтез и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия*. Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2016, 474 с. [Scherbakov A.B., Ivanova O.S., Spivak N.J., Kozik V.V. *Synthesis and biomedical applications of nanosized cerium dioxide*. Tomsk: Publishing house of tomsk state university, 2016, 474 p. (In Russ.).]
6. Стрельцов Е.А., *Электрохимия полупроводников*. Минск: БГУ, 2012, 159 с. [Strelcov E.A. *Electrochemistry of semiconductors*. Minsk: BSU, 2012, 159 p. (In Russ.).]
7. Younis A., Chu D., Li S. Cerium Oxide Nanostructures and their Applications, *Functionalized Nanomaterials*, 2016, vol. 3, pp. 53-68, doi: 10.5772/65937.
8. Voinarovski V.V., Martinovich G.G. Regulation of the structural stability of erythrocytes by hydrogen peroxide: mathematical model and experiment. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A.*, 2022. vol. 16, no. 1, pp. 91-105, doi: 10.1134/S1990747822010093.

**REGULATION OF THE REDOX-DEPENDENT MECHANISM OF ERYTHROCYTE ADAPTATION BY CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES****Voinarovski V.V., Martinovich G.G.**

Belarusian State University

*Bobruiskaya str. 5, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: voynarovskiy197@mail.ru*

Received 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0631

**Abstract.** In the present work, were analyzed the redox activity of cerium dioxide (CDC) nanoparticles of various sizes and studied their ability to regulate the adaptive mechanisms of erythrocytes in the presence of hydrogen peroxide. Cerium dioxide nanoparticles of various sizes were synthesized by homogeneous precipitation in the presence of hexamethylenetetramine at a temperature of 60°C and various synthesis times. The redox properties of cerium dioxide nanoparticles were evaluated spectrofluorimetrically based on the change in the rate of oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein with hydrogen peroxide. It was shown that of the three sizes studied, the largest nanoparticles have the highest stability and aggregation resistance. Using the method of scanning electron microscopy, it was found that these nanoparticles have a predominantly spherical shape with an average diameter of 50 nm and do not contain impurity atoms. As a result of studies in cell-free solutions, it was found that NDC exhibit antioxidant properties and reduce the rate of oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by hydrogen peroxide. Preliminary incubation of erythrocytes with hydrogen peroxide at a concentration of 100–300  $\mu\text{M}$  makes it possible to reduce the proportion of hemolyzed cells upon destruction by silver nitrate. The use of cerium dioxide nanoparticles leads to a potentiation of the protective effect and a shift in the hormesis region towards lower concentrations of hydrogen peroxide.

**Key words:** *Cerium dioxide nanoparticles, erythrocytes, hydrogen peroxide, adaptation*

## НОВЫЙ НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН ЛЬНА, ПОВЫШАЮЩЕЙ ВСХОЖЕСТЬ И ПРЕДОТВРАЩАЮЩЕЙ СЛИПАНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Будник М.И.<sup>1</sup>, Сергеев С.Н.<sup>2</sup>, Тараскин К.А.<sup>2</sup>, Апашева Л.М.<sup>3</sup>, Ростовцев Р.А.<sup>4</sup>, Ущاپовский И.В.<sup>4</sup>, Пролетова Н.В.<sup>4</sup>, Лобанов А.В.<sup>3,5</sup>, Степнова А.Ф.<sup>5</sup>, Казиев Г.З.<sup>5</sup>, Овчаренко Е.Н.<sup>3</sup>, Барнашова Е.К.<sup>6</sup>, Смурова Л.А.<sup>3</sup>, Грудзинский А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российская академия ракетных и артиллерийских наук

ул. 1-я Мясниковская, 3, стр. 3, г. Москва, 107564, РФ; e-mail: ziraf@mail.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт прикладной акустики

ул. 9 Мая, 7А, г. Дубна, 141981, РФ; e-mail: kant1958@yandex.ru

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ

<sup>4</sup> Федеральный научный центр лубяных культур

просп. Комсомольский, 17/56, г. Тверь, 170041, РФ

<sup>5</sup> Московский педагогический государственный университет

ул. М. Пироговская, 1/1, г. Москва, 119435, РФ

<sup>6</sup> Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока

ул. Тулайкова, 7, г. Саратов, 410010, РФ

Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0632

**Аннотация.** Лён – одна из ценнейших технических и масличных культур, значение которой в мире до сих пор очень велико. Россия на протяжении многих столетий являлась основным мировым производителем льна. Проблема возрождения производства, переработки льна и повышения его урожайности в Российской Федерации является особенно актуальной в настоящее время, так как лён становится основным сырьевым источником для пороховой промышленности и специальной химии взамен импортного хлопка. Известно, что после увлажнения семян льна при их предпосевной обработке выделяется слизь, и семена слипаются, что осложняет и замедляет процесс предпосевной подготовки семенного материала. Новый научно-методический подход к экологической обработке семян льна основан на создании рецептурного экологически чистого состава, состоящего из природного стимулятора роста и развития растений и полимера, образующего биodeградируемую полимерную пленку природного происхождения на семенах, не пропускающую слизь наружу и тем самым предотвращающую слипание семян после их обработки. В качестве стимулятора роста и развития льна использовался экологически чистый водный раствор пероксида водорода природной концентрации от  $2,94 \times 10^{-6}$  до  $82,00 \times 10^{-6}$  М, который одновременно являлся растворителем для природного биodeградируемого полимера инулина, представляющего из себя D-фруктозу, хорошо растворимую в воде; концентрация инулина при этом находилась в диапазоне 1,5-2,5%. В экспериментах использовали семена льна-долгунца сорта «Универсал» урожая 2020 года. Проводили полусухую обработку семян, затем их просушивали до полного высыхания и образования сыпучего состояния. Наилучший результат был получен после обработки семян льна составом, состоящим из экологически чистого водного раствора пероксида водорода с концентрацией  $5 \times 10^{-6}$  М и 2% раствора инулина, а именно: слипание семян отсутствовало, а всхожесть семян увеличилась на 30% по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** лён, экологически чистый пероксид водорода, инулин, обработка семян без слипания, повышение всхожести.

Лён – одна из ценнейших технических и масличных культур, значение которой в мире до сих пор очень велико. Россия на протяжении многих столетий являлась основным мировым производителем льна. Проблема возрождения производства, переработки льна и повышения его урожайности в Российской Федерации является особенно актуальной в настоящее время, так как лён становится основным сырьевым источником для пороховой промышленности и специальной химии взамен импортного хлопка [1].

Известно, что слизь из семян льна образуется во вторичной клеточной стенке эпидермальных клеток оболочки семян и способствует их распространению животными, адгезии с почвой, привлечению почвенных микроорганизмов в ризосфере, а также используется в питании проростка [2]. После увлажнения семян льна при их предпосевной обработке выделяется слизь, и семена слипаются, что осложняет и замедляет процесс предпосевной подготовки семенного материала.

Установлено влияние хитозанового препарата, полученного из некондиционных цист *artemia* sp., на энергию прорастания семян льна-долгунца [3]. Препарат оказывает ростостимулирующее действие, однако является чрезвычайно дорогим и непригоден для широкого внедрения, а также не предотвращает слипание семян.

Определена ростостимулирующая активность по отношению к семенам льна флавоноидов экстрактов почек тополя [4]. Экстракт почек тополя является стимулятором роста растений благодаря наличию в составе

насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, липидов, фенольных и полифенольных соединений, аминокислот, эфирных масел, витаминов, что обеспечивает стабильное ростостимулирующее действие и высокую семенную продуктивность льна. Способ получения экстракта включает использование почек тополя бальзамического, высушивание на воздухе, измельчение, экстракцию 90% этанолом в аппарате Сокслета, фильтрацию и упаривание до получения целевого продукта. Недостатками способа являются: сложная методика получения экстракта, дефицитность сырьевой базы, невозможность широкомасштабного использования, невозможность предотвращения слипания при обработке семян льна.

Известен способ выращивания льна-долгунца [5], позволяющий повысить урожайность семян и соломки льна-долгунца. Способ включает предпосевную обработку семян средством, содержащим 10-13% борной кислоты и 0,005-0,0005% гуминового стимулятора роста растений, полученного щелочным гидролизом низинного торфа водным раствором аммиака в присутствии перекиси водорода. К недостаткам способа относится многокомпонентность состава для обработки семян льна, возможность слипания семян после обработки, а также многоэтапность подготовки, что удорожает и усложняет работу с посевным материалом.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка нового экологически чистого рецептурного состава и способа его применения для предпосевной стимулирующей обработки семян льна, предотвращающей слипание семян и получения более высоких показателей всхожести.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для предпосевной обработки семян льна использовали рецептурный экологически чистый состав, состоящий из природного стимулятора роста и развития растений и полимера природного происхождения, образующего биodeградируемую полимерную пленку на семенах, не пропускающую слизь наружу и тем самым предотвращающую слипание семян после их обработки.

В качестве стимулятора роста и развития растений использовали экологически чистый водный раствор пероксида водорода природной концентрации.

Пероксид водорода – уникальное низкомолекулярное соединение, играющее существенную роль в жизнедеятельности растений [6].

Однако известно, что обычно для получения пероксида (перекиси) водорода используют электрохимический метод через надсерную кислоту и органический жидкофазного окисления изопропилового спирта согласно ГОСТ 177-88 «Водорода перекись. Технические условия». Высококонцентрированный раствор  $H_2O_2$  содержит токсические стабилизаторы (серная кислота, мышьяк и другие), добавляемые для замедления разложения пероксида водорода, которые не позволяют использовать его в растениеводстве.

В ходе экспериментальных исследований использовали устройство получения экологически чистого раствора пероксида водорода для стимуляции роста и развития растений из дистиллированной воды с помощью физических факторов [7], который не содержал каких-либо стабилизаторов и других примесей. Концентрацию водного раствора пероксида водорода определяли методом йодометрии [8].

Минимальный уровень концентрации экологически чистого водного раствора пероксида водорода, получаемой для стимуляции роста и развития растений, соответствует концентрации водного растворов пероксида водорода для биологически полноценной природной воды по Межгосударственному стандарту ГОСТ 32460-2013, а именно:  $2,94 \times 10^{-6}$  М.

Максимальный уровень концентрации экологически чистого водного раствора пероксида водорода, получаемой для стимуляции роста и развития растений, соответствует самой высокой концентрации пероксида водорода, зарегистрированной в дождевой воде на Земле в районе Мексиканского залива –  $82 \times 10^{-6}$  М [9]. Для примера, под Москвой, в целом за период с 1874 по 1894 гг. обнаружено, что содержание  $H_2O_2$  «въ дождевой водѣ 0,4–1 мгр. на 1 литръ» [цит. по 10, с. 215], или  $11,8 \times 10^{-6}$  –  $29,4 \times 10^{-6}$  М.

В качестве полимера природного происхождения использовали инулин – порошок белого цвета, хорошо растворимый в воде, представляющий из себя полимер D-фруктозы. Инулин выделен из корней топинамбура в соответствии со способом, изложенным в патенте РФ № 2485958 [11], с модификацией, основанной на кавитационной обработке сырья в роторно-пульсационном аппарате.

Растворителем являлась деионизированная вода, полученная по ГОСТ Р 52501-2005; допускается использование дистиллированной воды по ГОСТ Р 58144-2018.

В экспериментах использовали три экологически чистых рецептурных составов.

Первый рецептурный состав:

экологически чистый водный раствор пероксида водорода природной концентрации  $50 \times 10^{-6}$  М;  
2% водный раствор природного биodeградируемого полимера инулина.

Второй рецептурный состав:

экологически чистый водный раствор пероксида водорода природной концентрации  $5 \times 10^{-6}$  М;  
2% водный раствор природного биodeградируемого полимера инулина.

Третий рецептурный состав:

2% водный раствор природного биodeградируемого полимера инулина.





**Таблица 2.** Наличие слипания семян льна-долгунца сорта «Универсал» после обработки вторым рецептурным составом и количество проросших семян в процентах на 2, 3 и 4 сутки в контрольной и опытной группах

Группы	Наличие слипания	Количество проросших семян, %		
		2 сутки	3 сутки	4 сутки
Контрольная	есть	34	50	61
Опытная с составом: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5×10 <sup>-6</sup> М и 2% инулин	нет	60	80	90

Представленные результаты показывают, что после обработки семян льна составом, состоящим из экологически чистого раствора пероксида водорода с концентрацией 50×10<sup>-6</sup> М и 2% раствора инулина, слипание семян отсутствует, а процент проросших семян увеличивается на 14% по сравнению с контролем.

Во втором эксперименте в опытной группе семена льна-долгунца сорта «Универсал» обработаны по описанному выше способу составом, состоящим из экологически чистого раствора пероксида водорода с концентрацией 5×10<sup>-6</sup> М и 2% раствора инулина.

В контрольной группе использовали только деионизированную воду.

В ходе эксперимента обращали внимание на наличие слипания семян льна-долгунца сорта «Универсал» после их обработки и определяли количество проросших семян в процентах на 2, 3 и 4 сутки в контрольной и опытной группах. Результаты представлены в таблице 2.

Представленные результаты показывают, что после обработки семян льна составом, состоящим из экологически чистого раствора пероксида водорода с концентрацией 5×10<sup>-6</sup> М и 2% раствора инулина, слипание семян отсутствует, а процент проросших семян увеличивается на 30% по сравнению с контролем.

В третьем эксперименте в опытной группе семена льна-долгунца сорта «Универсал» обработаны по описанному выше способу составом, состоящим только из 2% раствора инулина без пероксида водорода.

В контрольной группе использовали только деионизированную воду.

В ходе эксперимента обращали внимание на наличие слипания семян льна-долгунца сорта «Универсал» после их обработки и определяли количество проросших семян в процентах на 2, 3 и 4 сутки в контрольной и опытной группах. Результаты представлены в таблице 3.

Представленные результаты показывают, что после обработки семян льна составом, состоящим только из 2% раствора инулина без присутствия пероксида водорода, слипание семян отсутствует, а процент проросших семян практически ничем не отличается от контроля.

Определение интенсивности пробуждения семян по выходу метаболитов в воду в опытной и контрольной группах на спектрофотометре Specord UV-Vis при  $\lambda_{\max} = 207$  нм подтверждает полученные выше данные: показатель оптической плотности через один час в опыте был в 1,75 раз больше, чем в контроле (рис. 2).

Из полученных данных следует, что процесс пробуждения семян начинается уже с первых минут контакта семян с водой, что фиксируется по выходу метаболитов в раствор, в то время как начало прорастания семян по морфологическим тестам определяется, начиная со вторых суток опыта.

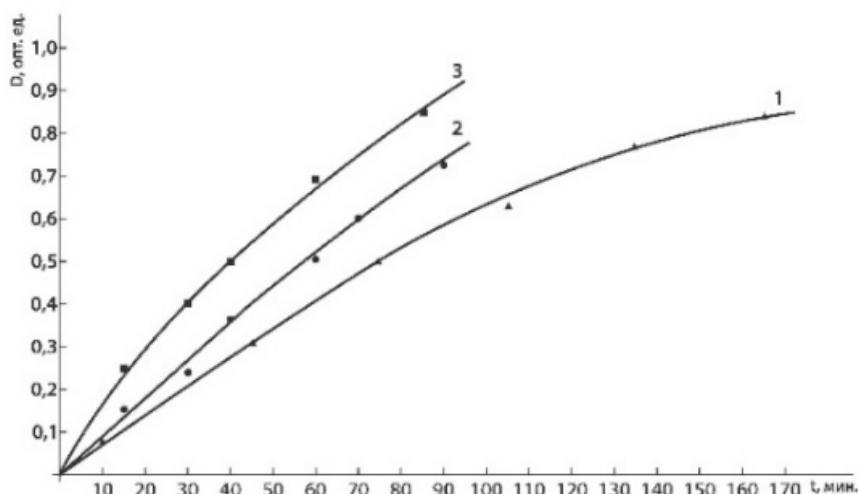
По результатам экспериментов наилучший результат был получен после обработки семян льна составом, состоящим из экологически чистого водного раствора пероксида водорода с концентрацией 5×10<sup>-6</sup> М и 2% раствора инулина, а именно: на 4 сутки слипание семян отсутствовало, а всхожесть семян увеличилась на 30% по сравнению с контролем и на 15% по сравнению с аналогичным показателем при обработке семян раствором с концентрацией 50×10<sup>-6</sup> М.

Интересно отметить, что после аналогичной полусухой обработки семян озимой пшеницы «Саратовская 90» такими же концентрациями экологически чистого водного раствора пероксида водорода сырая и сухая масса надземной части пшеницы в фазе трубкования была соответственно на 9% и 23% больше при предпосевной обработке семян раствором меньшей концентрацией, а именно: 5×10<sup>-6</sup> М, по сравнению с обработкой семян раствором с концентрацией 50×10<sup>-6</sup> М [12].

Таким образом, разработан новый научно-методический подход к экологической обработке семян льна, повышающей всхожесть и предотвращающей слипание посевного материала, что является особенно актуальным в настоящее время, когда помимо традиционного использования лён становится основным сырьевым источником для пороховой промышленности и специальной химии взамен импортного хлопка.

**Таблица 3.** Наличие слипания семян льна-долгунца сорта «Универсал» после обработки третьим рецептурным составом и количество проросших семян в процентах на 2, 3 и 4 сутки в контрольной и опытной группах

Группы	Наличие слипания	Количество проросших семян, %		
		2 сутки	3 сутки	4 сутки
Контрольная	есть	34	50	61
Опытная с составом: 2% инулин	нет	35	50	60



**Рисунок 2.** Кинетические кривые выхода метаболитов после обработки семян льна сорта «Универсал»: кривая 1 – семена без предварительной обработки (контроль); кривая 2 – семена, предварительно обработанные третьим рецептурным составом (инулин + вода); кривая 3 – семена, предварительно обработанные вторым рецептурным составом ( $\text{H}_2\text{O}_2$   $5 \times 10^{-6}$  М и 2% инулин)

#### Список литературы / References:

1. Лён в пороховой промышленности. 3-е изд., доп. и перераб. Под ред. И.Н. Торгуна. М.: ФГУП «ЦНИИХМ», 2021, 392 с. [*Len v porohovoy promyshlennosti*. 3-e izd., dop. i pererab. Pod red. I.N. Torguna. M.: FGUP «СНИИХМ», 2021, 392 p. (In Russ.)]
2. Пороховинова Е.А., Павлов А.В., Брач Н.Б., Морван Н. Углеводный состав слизи из семян льна и его связь с морфологическими признаками. *Сельскохозяйственная биология*, 2017, т. 52, № 1, с. 161-171 [Porohovinova E.A., Pavlov A.V., Brach N.B., Morvan N. Uglevodnyi sostav slizi iz semyan lna i ego svyaz s morfologicheskimi priznakami. *Selskhozyaistvennaya biologiya*, 2017 vol. 52, no. 1, pp. 161-171, doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.161.rus (In Russ.)]
3. Морозова Е.А., Верещагин А.Л. Влияние хитозанового препарата, полученного из некондиционных цист *artemia sp.* на энергию прорастания семян льна-долгунца. *Сборник статей III Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – сельскому хозяйству»*. Барнаул, 12-13 марта 2008 г., т. 1, с. 372-373 [Morozova E.A., Vereshagin A.L. Vliyanie hitozanovogo preparata, poluchennogo iz nekonkicionnih cist *artemia sp.* na energiu prorostaniya semyan lna-dolgunca. *Sbornik statei III Mezdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferencii «Agrarnaya nauka – selskomu hozyaistvu»*. Barnaul, 12-13 march 2008, vol. 1, pp. 372-373 (In Russ.)]
4. Мещанова А.Г., Бызова Ю.С., Островной К.А., Поляков В.В. Ростостимулирующая активность флавоноидов экстрактов почек тополя бальзамического *populus balsamifera*. *Химия растительного сырья*, 2022, № 4, с. 269-276 [Meshanova A.G., Bizova U.S., Ostrovnoy K.A., Polyakov V.V. Rostostimuliruushaya aktivnost phlavanoidov ekstraktov pochek topolya balzamicheskogo *populus balsamifera*. *Himiya rastitel'nogo sirya*, 2022, no. 4, pp. 269-276, doi: 10.14258/jcprfm.20220411385 (In Russ.)]
5. Сорокин И.Б., Титова Э.В., Касимова Л.В., Кравец А.В. Способ выращивания льна-долгунца. Патент РФ № 2425481, 2011 [Sorokin I.B., Titova E.V., Kasimova L.V., Kraves A.V. *Sposob virashivaniya lna-dolgunca*. Patent RF № 2425481, 2011 (In Russ.)]
6. Комиссаров Г.Г. *Фотосинтез: физико-химический подход*. М.: Эдиториал УРСС, 2003, 224 с. [Komissarov G.G. *Photosynteze: fiziko-hemicheskii podhod*. M.: Editorial URSS, 2003, 224 p. (In Russ.)]
7. Будник М.И., Стребков Д.С., Евстафеев А.С., Апашева Л.М., Лобанов А.В., Овчаренко Е.Н., Сурдо А.В., Митьков Д.Н. Устройство получения экологически чистого раствора пероксида водорода для стимуляции роста и развития растений. Патент РФ № 2773011, 2022 [Budnik M.I., Strebkov D.S., Evstafeev A.S., Apasheva L.M., Lobanov A.V., Ovcharenko E.N., Surdo A.V., Mitkov D.N. *Ustroystvo polucheniya ekologicheskii chistogo rastvora peroksida vodoroda dlya stimulyacii rosta i razvitiya rasteniy*. Patent RF № 2773011, 2022 (In Russ.)]
8. Лобанов А.В., Рубцова Н.А., Комиссаров Г.Г. Фотокаталитическая активность хлорофилла в образовании пероксида водорода в воде. *Доклады Академии наук*, 2008, т. 421, № 6, с. 773-776. [Lobanov A.V., Rubcova N.A., Komissarov G.G. Photocataliticheskaya aktivnost hlorofilla v obrazovanii peroksida vodoroda v vode. *Dorlady Akademii nauk*, 2008, vol. 421, no 6, pp. 773-776 (In Russ.)]
9. Cooper W.J., Saltzman E.S., Zika R.G. The contribution of rainwater to variability in surface ocean hydrogen peroxide. *Journal of Geophysical Research*, 1987, vol. 92, pp. 2970-2980, doi: 10/1029/JC092iC03p02970.
10. Энциклопедический словарь Ф.А. Брокгауза, И.А. Эфрона, статья «Перекись водорода», СПб., 1898, т. XXIII, с. 215 [Enciklopedicheskiy slovar F.A. Brokgauza, I.A. Efrona, statya «Perekis vodoroda» SPb., 1898, vol. XXIII, p. 215 (In Russ.)].

11. Смирнова Т.И., Осербаяев А.К., Алексеев А.В., Малахаев Е.Д., Муравьев Д.С. *Способ получения инулина из инулинсодержащего растительного сырья, в частности из клубней топинамбура, для медицинских и пищевых целей*. Патент РФ № 2485958, 2013 [Smirnova T.I., Oserbaev A.K., Alekseev A.V., Malahaev E.D., Muravev D.S. *Sposob polucheniya inulina iz inulinsoderzashchego rastitel'nogo sirya, v chastnosti iz klubney topinambura, dlya medicinskih i pishchevikh celei*. Patent RF № 2485958, 2013 (In Russ.)].

12. Стребков Д.С., Будник М.И., Душков В.Ю., Апашева Л.М., Лобанов А.В., Овчаренко Е.Н., Турбин В.В., Розанцев М.В., Беляков А.М., Кулик К.Н. Повышение урожайности озимой пшеницы с помощью экологически чистого водного раствора пероксида водорода природной концентрации. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*, 2022, № 4, с. 64-67 [Strebkov D.S., Budnik M.I., Dushkov V.U., Apasheva L.M., Lobanov A.V., Ovcharenko E.N., Turbin V.V., Rozancev M.V., Belyakov A.M., Kulik K.N. Povishenie urozainosti ozimoi pshenici s pomoshchyu ekologicheskii chistogo vodnogo rastvora peroksida vodoroda prirodnoy konsentrasii. *Vestnik rossiyskoy selskhozaystvennoy nauki*, 2022, no. 4, pp. 64-67, doi: 10.31857/2500-2082/2022/4/64-67 (In Russ.)].

## A NEW SCIENTIFIC AND METHODOLOGICAL APPROACH TO THE ECOLOGICAL PROCESSING OF FLAX SEEDS, WHICH INCREASES GERMINATION AND PREVENTS THE ADHESION OF SEED MATERIAL

**Budnik M.I.<sup>1</sup>, Sergeev S.N.<sup>2</sup>, Taraskin K.A.<sup>2</sup>, Apasheva L.M.<sup>3</sup>, Rostovcev R.A.<sup>4</sup>, Uschapovsky I.V.<sup>4</sup>, Proletova N.V.<sup>4</sup>, Lobanov A.V.<sup>3,5</sup>, Stepnova A.F.<sup>5</sup>, Kaziev G.Z.<sup>5</sup>, Ovcharenko E.N.<sup>1</sup>, Barnashova E.K.<sup>6</sup>, Smurova L.A.<sup>3</sup>, Grudzinsky A.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Russian Academy of Missile and Artillery Sciences

*1-ya Myasnikovskaya str., 3, build. 3, Moscow, 107564, Russia; e-mail: ziraf@mail.ru*

<sup>2</sup> Institute of Engineering Acoustics

*9-May str., 7A, Dubna, 141981, Russia; e-mail: kant1958@yandex.ru*

<sup>3</sup> N.N. Semenov Federal Research Centre for Chemical Physics  
of the Russian Academy of Sciences

*Kosygina str., 4, Moscow, 119991, Russia*

<sup>4</sup> Federal Scientific Centre of Bast Crops  
*prosp. Komsomolsky, 17/56, z. Tver', 170041, Russia*

<sup>5</sup> Moscow Pedagogical State University  
*M. Pirogovskaya str., 1/1, Moscow, 119435, Russia*

<sup>6</sup> Federal Agrarian Scientific Center of the South-East  
*Tulaykova str., 7, Saratov, 410010, Russia*

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0632

**Abstract.** Flax is one of the most valuable technical and oilseed crops, the importance of which is still very great in the world. Russia has been the world's main producer of flax for many centuries. The problem of reviving the production, processing of flax and increasing its yield in the Russian Federation is particularly relevant at the present time, since flax is becoming the main raw material source for the powder industry and special chemicals instead of imported cotton. It is known that after moistening flax seeds during their pre-sowing treatment, mucus is released, and the seeds stick together, which complicates and slows down the process of pre-sowing preparation of seed material. A new scientific and methodological approach to the ecological treatment of flax seeds is based on the creation of a prescription environmentally friendly composition consisting of a natural stimulator of plant growth and development and a polymer forming a biodegradable polymer film of natural origin on seeds that does not let mucus out and thereby prevents seeds from sticking together after processing. An environmentally friendly aqueous solution of hydrogen peroxide of natural concentration from  $2.94 \times 10^{-6}$  to  $82.00 \times 10^{-6}$  M was used as a stimulant for the growth and development of flax, which at the same time was a solvent for the natural biodegradable polymer inulin, which is D-fructose, highly soluble in water; the concentration of inulin was in the range of 1.5-2.5%. In the experiments, flax seeds of the Universal variety of the 2020 harvest were used. Semi-dry treatment of seeds was carried out, then they were dried until completely dry and the formation of a loose state. The best result was obtained after processing flax seeds with a composition consisting of an environmentally friendly aqueous solution of hydrogen peroxide with a concentration of  $5 \times 10^{-6}$  M and 2% inulin solution, namely: there was no seed sticking, and seed germination increased by 30% compared to the control.

**Key words:** *flax, environmentally friendly hydrogen peroxide, inulin, seed treatment without sticking, increased germination.*

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ *MAGALLANA GIGAS* ПРИ ЗАРАЖЕНИИ *PIONE VASTIFICA*

Подольская М.С., Челебиева Э.С., Гостюхина О.Л., Лавриченко Д.С., Кладченко Е.С.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: podolskaya m99@bk.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0633

**Аннотация.** Тихоокеанская устрица, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), является важным промысловым видом Черноморского побережья России. Несмотря на благоприятные условия для развития марикультуры в регионе, существует ряд биотических факторов, способных нанести ущерб устричным фермам. В частности, сверлящая губка *Pione vastifica* (Hancock, 1849). Сверлящие губки представляют собой серьезную проблему для марикультурных хозяйств, поскольку пораженные моллюски изымаются из товарооборота, что влечет за собой экономические убытки. В работе исследовали влияние сверлящей губки на функциональное состояние гемоцитов (способность к продукции активных форм кислорода - АФК и мембранный потенциал митохондрий) и антиоксидантный статус мантии тихоокеанских устриц. У гемоцитов моллюсков, пораженных *P. vastifica*, был значительной ингибирован мембранный потенциал митохондрий. Кроме этого, гемоциты “зараженных” устриц характеризовались более высоким уровнем продукции АФК, по сравнению с группой “здоровых” устриц. Увеличение содержания АФК не сопровождалось ростом активности каталазы. Отсутствие роста активности каталазы на фоне избыточной продукции АФК может приводить к различным физиологическим и метаболическим нарушениям и снижению скорости роста моллюсков. Настоящее исследование способствует расширению понимания о влиянии сверлящей губки (*P. vastifica*) на функциональное состояние распространенного объекта региональной марикультуры - тихоокеанскую устрицу (*M. gigas*).

**Ключевые слова:** гемоциты, антиоксиданты, активные формы кислорода, мембранный потенциал митохондрий, каталаза, сверлящая губка.

Двустворчатые моллюски являются объектом активного марикультурного промысла во всем мире. Патогенные бактерии и простейшие паразиты наиболее часто упоминаются в литературе как факторы, ограничивающие культивирование двустворок в связи с высоким уровнем смертности зараженных организмов [1]. Однако не меньший ущерб марикультурным хозяйствам могут нанести представители типа губок (Porifera) [2,3]. Устриц *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), культивируемых в Черноморском регионе, поражают сверлящие губки семейства Clionidae, в частности *Pione vastifica* (Hancock, 1849) [4,5]. Губка поселяется на раковине моллюска, проделывая в ней отверстия путем химического и механического травления, в результате чего наблюдается увеличение толщины раковины и снижение темпов роста устриц [6]. Не смотря на очевидную актуальность исследования взаимодействия между моллюсками и сверлящими губками, до настоящего момента слабо изучено функциональное состояние двустворок при инвазии. Имеющиеся в литературе исследования сосредоточены на размерно-весовых характеристиках моллюсков [7-9], в нескольких работах показано, что пораженные сверлящей губкой моллюски в большей степени подвержены микробному заражению [10-12]. Можно предположить, что инвазия сверлящей губкой приводит к ослаблению “здоровья” моллюсков за счет угнетения иммунной и антиоксидантной систем, однако, последнее утверждение не подкрепляется имеющимися в литературе данными. В настоящий момент отсутствуют фундаментальные знания о взаимодействии губки с организмом устриц, неизвестна степень ее негативного влияния на организм моллюска, не раскрыты механизмы, приводящие к ухудшению ростовых показателей и гибели зараженных устриц. Вместе с тем, понимание процессов, лежащих в основе патологических изменений в организме двустворок, зараженных сверлящей губкой, необходимо для разработки эффективных систем лечения, не приводящих к необратимым функциональным изменениям организма “хозяина”.

Защита от возможных вредителей обеспечивается гемоцитами, клетками гемолимфы, которые в ответ на действие патогена реагируют рядом цитотоксических реакций [13]. Гемоциты отвечают за переваривание, транспортировку и распределение питательных веществ, восстановление раковины и тканей моллюсков, а также неспецифический иммунный ответ [14]. Восстановление раковины является энергозатратным процессом [15]. Большую часть клеточного запаса энергии генерируют митохондрии во время клеточного дыхания [16]. Кроме того, митохондрии являются основным источником клеточных активных форм кислорода (АФК) [17]. С другой стороны, избыточное производство АФК может привести к повреждению внутриклеточных структур организма [18]. В ответ на гиперпродукцию АФК в организме активизируется антиоксидантная система защиты, которая инактивирует свободные радикалы [19,20]. Одним из основных ферментов, участвующих в каскаде антиоксидантных реакций, является каталаза (КАТ) [21]. КАТ участвует в разложении перекиси водорода, предотвращая образование гидроксильных радикалов [22]. Комплексные исследования физиологических и иммунологических изменений в организме моллюсков, индуцированных инвазией паразитов, патогенов и различных аменсало, дают представление о значении этих стрессоров как в биологии популяции, так и в производстве коммерчески важных двустворчатых моллюсков.

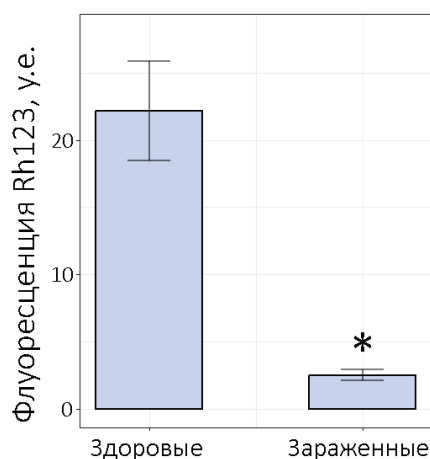


Рисунок 1. Мембранный потенциал митохондрий гемоцитов *Magallana gigas* (\* $p \leq 0,05$ )

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы была оценка влияния сверлящей губки *P. vastifica* на функциональный статус тихоокеанской устрицы *M. gigas*, а именно на мембранный потенциал митохондрий клеток, продукцию АФК и активность КАТ в мантии моллюска.

Устриц собирали в прибрежной акватории Севастопольской бухты ( $n=60$ , масса  $77,7 \pm 8,2$  г, длина раковины  $11,4 \pm 2,6$  см) при температуре воды  $20^\circ\text{C}$ , солености 17–18 ‰, содержании кислорода 7,2–8,5 мг/л. Для оценки воздействия сверлящей губки на организм устриц делили на 2 группы: контрольную (без видимого повреждения раковины, “здоровые”) и опытную (моллюски, имеющие красные вкрапления на раковине или видимые внешние повреждения, “зараженные”). Группы моллюсков акклиматизировали к лабораторным условиям в отдельных аквариумах в течение 7 дней. По окончании периода акклиматизации у каждой группы моллюсков отбирали гемолимфу и ткани мантии. Способность гемоцитов к спонтанной продукции АФК оценивалась с помощью метода проточной цитометрии по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA, Sigma) Мембранный потенциал митохондрий клеток гемолимфы оценивали по изменению интенсивности флуоресценции гемоцитов, окрашенных красителем родамин 123 (Rh123, Sigma Aldrich). Активность каталазы измеряли по реакции взаимодействия остаточного количества перекиси водорода с молибдатом аммония (Goth, 1991). Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Оценка достоверности полученных данных проводилась с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Энергетический баланс является фундаментальной основой для устойчивости организма к стрессовым факторам среды [22]. По степени нарушения энергетического баланса можно определить уровень стресса и адаптивную стратегию [23]. В настоящем исследовании интенсивность флуоресценции Rh123, характеризующих мембранный потенциал митохондрий, у пораженных губкой устриц была существенно ниже (в 8,8 раз), чем в контрольной группе ( $p < 0,01$ ). Значительное снижение мембранного потенциала митохондрий свидетельствует о том, что у устриц после заражения сверлящей губкой происходит угнетение аэробного метаболизма (метаболическая депрессия) [24].

Снижение мембранного потенциала митохондрий гемоцитов обычно сопровождается подавлением способности к генерации окислительного взрыва [25]. Такая корреляция связана с тем, что митохондрии считаются основным источником АФК в гемоцитах [26]. Результаты настоящего исследования показали, что

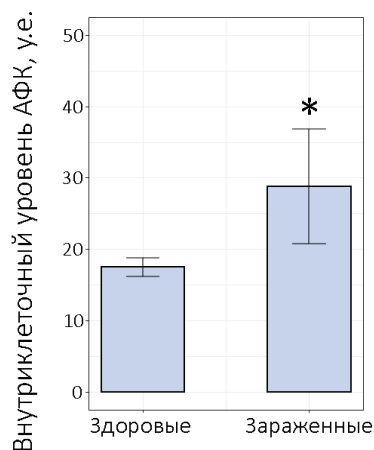


Рисунок 2. Спонтанная продукция АФК гемоцитами *Magallana gigas*

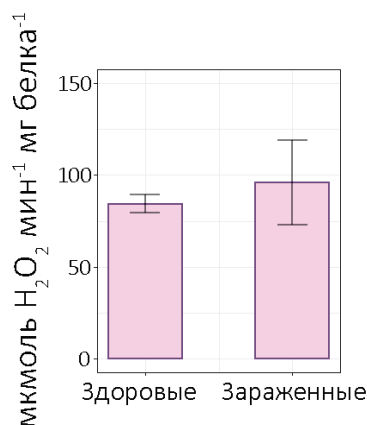


Рисунок 3. Активность каталазы в мантии *Magallana gigas*

инвазия сверлящей губки, напротив, значительно стимулировала продукцию АФК в гемоцитах тихоокеанской устрицы *M.gigas* ( $P < 0,05$ ). Вероятно, рост уровня АФК после заражения сверлящей губкой происходит за счет других источников АФК, например, за счет эндоплазматического ретикулума [27]. Уровень внутриклеточных АФК был примерно в 1,6 раза выше в опытной группе в сравнении с контролем. Способность гемоцитов к продукции активных форм кислорода является индикаторным показателем функционального состояния двустворчатых моллюсков [28]. Генерация окислительного взрыва системой хозяина является одной из наиболее важных стратегий защиты от паразитов. [29,30]. Чрезмерное накопление АФК и окислительно-восстановительный дисбаланс [31], что приводит к перекисному окислению липидов мембран, деформации клеточной структуры, повреждению ДНК, нарушению белкового обмена, деградации, физиологическим и метаболическим нарушениям [32] и, в конечном итоге, торможению роста моллюсков.

Уровень активности КАТ оценивали в мантии, как барьерной ткани в организме моллюсков. Содержание фермента в контрольной и опытной группах статистически значимо не отличалось. Несмотря на то, что в гемоцитах зафиксирован высокий уровень АФК, в ткани, наиболее близко расположенной к сверлящей губке, не изменялась активность антиоксидантных. Вероятно, антиоксидантная система мантии устрицы справляется с развитием окислительного стресса.

Таким образом, результаты работы демонстрируют, что инвазия *P. vastifica* не оказывает значимого влияния на активность КАТ, являющейся одним из основных ферментов антиоксидантного комплекса. Однако клетки гемолимфы гораздо более чувствительны к поражению сверлящей губки, на что указывает увеличение продукции АФК и снижение мембранного потенциала митохондрий.

*Работа выполнена в рамках госзадания № 121102500161-4 «Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем» и гранта РНФ № 23-26-00019 «Сверлящая губка Черного моря: влияние на иммунную систему устриц и оценка эффективности метода гипосмотического шока для борьбы с ее распространением на марикультурной ферме».*

#### Список литературы / References:

1. Sindermann C.J., Rosenfield A. Principal diseases of commercially important marine bivalve Mollusca and Crustacea. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service of the USA*, 1967, vol. 66, pp. 335-385.
2. Carver C.E., Theriault I., Mallet A.L. Infection of cultured eastern oysters *Crassostrea virginica* by the boring sponge *Cliona celata*, with emphasis on sponge life history and mitigation strategies. *Journal of Shellfish Research*, 2010, vol. 29, no. 4, pp. 905-915.
3. Watts J.C. et al. Examination of the potential relationship between boring sponges and pea crabs and their effects on eastern oyster condition. *Diseases of aquatic organisms*, 2018, vol. 130, no. 1, pp. 25-36.
4. Lebedovskaya M.V. Shell affection of pacific oyster *Crassostrea gigas*, cultivates in the Black Sea by the boring sponge *Pione vastifica*. *Ekologiya Morya*, 2009, no. 77, p. 67.
5. Копытина N.I. Fungi of the Black Sea basin: directions and perspectives of research. *Marine Biological Journal*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 15-33.
6. Coleman S.E. *The effects of boring sponge on oyster soft tissue, shell integrity, and predator-related mortality*: The University of North Carolina at Chapel Hill, 2014.
7. Кракатица Т.Ф. Сокращение ареала и уменьшение численности устриц в Егорлыцком заливе. *Моллюски. Основные результаты их изучения*, Л.: Наука, 1979, с. 112-114 [Kratitsa T.F. Reduction of the range and decrease in the number of oysters in the Yegorlytsky Bay. *Shellfish. The main results of their study*, L.: Nauka, 1979, pp. 112-114 (In Russ.)].
8. Dieudonne J., Carroll J.M. The impacts of boring sponges on oyster health across multiple sites and tidal heights. *Estuaries and Coasts*, 2022, vol. 45, no. 1, pp. 213-224.

9. Лебедевская М.В. Зараженность устриц *Crassostrea gigas* сверлящей полихетой *Polydora websteri* в марихозяйствах в озере Донузлав (Крым). Школа по теоретической и морской паразитологии, 2019, с. 94. [Lebedovskaya M.V. Infestation of *Crassostrea gigas* oysters by drilling polychaete *Polydora websteri* in marine farms in Lake Donuzlav (Crimea). *School of Theoretical and Marine Parasitology*, 2019, pp. 94-94 (In Russ.)].
10. Лебедевская М.В. Морфометрические и микробиологические показатели гигантской устрицы *Crassostrea gigas* при поражении сверлящей губкой *Pione vastifica*, 2013 [Lebedovskaya M.V. Morphometric and microbiological parameters of the giant oyster *Crassostrea gigas* when affected by the drilling sponge *Pione vastifica*, 2013 (In Russ.)].
11. Watts J.C., Carroll J.M., Munroe D.M., Finelli C.M. Examination of the potential relationship between boring sponges and pea crabs and their effects on eastern oyster condition. *Diseases of aquatic organisms*, 2018, vol. 130, no. 1, pp. 25-36.
12. Hanley T.C., White J.W., Stallings C.D., Kimbro D.L. Environmental gradients shape the combined effects of multiple parasites on oyster hosts in the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 2019, vol. 612, pp. 111-125.
13. Eleftherianos I., Heryanto C., Bassal T., Zhang W., Tettamanti G., Mohamed A. Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*, 2021, vol. 164, no. 3, pp. 401-432.
14. Donaghy L., Kraffe E., Goic N., Lambert C., Volety A.K., Soudant P. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement, 2012.
15. Palmer A.R. Calcification in marine molluscs: how costly is it? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, vol. 89, no. 4, pp. 1379-1382.
16. Solaini G. et al. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Bioscience reports*, 2007, vol. 27, no. 1-3, pp. 11-21.
17. Samain J.F. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquatic Living Resources*, 2011, vol. 24, no. 3, pp. 227-236.
18. Кладченко Е.С., Андреева А.Ю., Кухарева Т.А. Влияние краткосрочной ранжированной гипоксии на функциональные и морфологические показатели гемоцитов тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, 2022, т. 58, № 1, с. 43-50 [Kladchenko E.S., Andreeva A.Yu., Kukhareva T.A. Influence of short-term ranked hypoxia on functional and morphological parameters of hemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2022, vol. 58, no. 1, pp. 43-50 (In Russ.)].
19. Victor V.M., Rocha M., Esplugues J.V. Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Current pharmaceutical design*, 2005, vol. 11, no. 24, pp. 3141-3158.
20. Sukoyan G.V., Gongadze N.V., Demina N.B., Golovach V.V., Tsvitshivadze E.T., Bakuridze A.D. Ageing Induced Hyperproduction of Reactive Oxygen Species and Dysbalance in Enzymatic Link of Antioxidant Defense System of Skin and Therapeutic Efficacy of Artichoke Extract. *European Journal of Medicinal Plants*, 2019, vol. 27, no. 4, pp. 1-10.
21. Ighodaro O.M., Akinloye O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 2018, vol. 54, no. 4, pp. 287-293.
22. Ho Y.S. et al. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 31, pp. 32804-32812.
23. Sokolova I.M. et al. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine environmental research*, 2012, vol. 79, pp. 1-15.
24. Sokolova I.M., Lannig G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate research*, 2008, vol. 37, no. 2-3, pp. 181-201.
25. Russo J., Madec L. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell and Tissue Research*, 2007, vol. 328, pp. 431-441.
26. Donaghy L. et al. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement, 2012.
27. Pomponi S.A. Excavation of calcium carbonate substrates by boring sponges: ultrastructure and cytochemistry. University of Miami, 1977.
28. Anderson R.S. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve molluscs. *Developmental & Comparative Immunology*, 1994, vol. 18, no. 2, pp. 89-96.
29. Motavallihaghi S. et al. The role of *Acanthamoeba castellanii* (T4 genotype) antioxidant enzymes in parasite survival under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. *Parasitology International*, 2022, vol. 87, p. 102523.
30. Donaghy L. et al. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, 2009, vol. 297, no. 1-4, pp. 10-24.
31. Sharma S.S., Dietz K.J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in plant science*, 2009, vol. 14, no. 1, pp. 43-50.
32. De R., Mazumder S., Bandyopadhyay U. Mediators of mitophagy that regulate mitochondrial quality control play crucial role in diverse pathophysiology. *Cell biology and toxicology*, 2021, vol. 37, no. 3, pp. 333-366.

## FUNCTIONAL STATUS OF MAGALLANA GIGAS INFECTED BY PIONE VASTIFICA

Podolskaya M.S., Chelebieva E.S., Gostyukhina O.L., Lavrichenko D.S., Kladchenko E.S.

FRC "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS"

Nakhimov Ave. 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: podolskaya\_m99@bk.ru

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0633

**Abstract.** Pacific oyster *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) is an important commercial species of the Black Sea coast of Russia. Black Sea is favorable for the development of regional mariculture, but the existing biotic factors may lead to damage to an oyster farm. In particular, boring sponge *Pione vastifica* (Hancock, 1849). Boring sponges are a serious problem for mariculture farms, because the affected mussels are withdrawn from trade, which entails economic losses. In this work, the effect of boring sponges on the functional state of hemocytes (the ability to produce reactive oxygen species - ROS and the membrane potential of mitochondria) and the antioxidant status of the mantle of the Pacific oyster were studied. The membrane potential of mitochondria was significantly inhibited in the hemocytes of mollusks affected by *P. vastifica*. In addition, the hemocytes of "infected" oysters were characterized by a higher level of ROS production compared to the group of "healthy" oysters. The increase in ROS was not accompanied by an increase in catalase activity. The absence of an increase in catalase activity against the background of excessive ROS production can lead to various physiological and metabolic disorders and a decrease in the growth rate of mollusks. The present study contributes to the expansion of understanding about the influence of the drilling sponge (*P. vastifica*) on the functional state of a common object of regional mariculture – the Pacific oyster (*M. gigas*).

**Key words:** hemocytes, antioxidantes, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, catalase, boring sponge.



Научный журнал  
**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ**  
Том 8, № 3, 2023

**Russian Journal of Biological Physics and Chemistry**  
Volume 8, No. 3, 2023

**Рубрики в соответствии с номенклатурой научных специальностей:**

Биологические науки (1.5)  
1.5.2 Биофизика  
1.5.8 Математическая биология, биоинформатика  
1.5.20 Биологические ресурсы

**Адрес редакции:**

ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация  
Тел. +7(8692) 43-51-10, e-mail: journal@sevbprc.ru

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе  
ИП Крыховецкий-Кошеев Александр Андреевич  
ОГРНИП 318920400019241  
COLOR CITY Цифровая типография  
ул. Борисова, 4, г. Севастополь, 299059, Российская Федерация

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС 77-72655 от 16.04.2018, выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Публикуемые материалы прошли процедуру рецензирования и экспертного отбора. Авторы несут ответственность за добросовестность фактов, цитат, имен собственных, географических названий и другой информации. Редакция не несет ответственности за нарушение авторами исключительных прав на результаты интеллектуальной деятельности третьих лиц. Мнение редакции может не совпадать с мнением автора. При перепечатке материалов ссылка на журнал «Актуальные вопросы биологической физики и химии» обязательна.

**Учредитель и издатель:**

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»  
ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация

**Главный редактор:** Евстигнеев М.П.

Компьютерная верстка: Воронин Д.П., Кальпа В.А., Глухов Л.А.

---

Формат – 60x84/8. Бумага офсетная. Гарнитура – Times New Roman. Усл. печ. л. – 16,3.

Тираж – 40 экз. Подписано в печать 22.08.2023. Дата выхода в свет 09.09.2023.

Свободная цена.

---