

ISSN 2499-9962

**НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ**

**Актуальные вопросы  
биологической физики  
и химии**

**Том 9, № 3  
2024**

**Севастополь**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ  
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И  
ХИМИИ**

**Научный журнал**

**Том 9, № 3  
2024**

**RUSSIAN JOURNAL of  
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY  
Volume 9, No. 3, 2024**

Севастополь  
2024

## 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 9, № 3, 2024

## ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- О.В. Башарина, А.А. Лушева, У.С. Секретарева, В.Г. Артюхов**  
Влияние УФ-излучения на образование комплексов бычьего сывороточного альбумина с лизоцимом и олеиновой жирной кислотой ..... 215
- Д.Н. Чернышев, В.С. Ключкова**  
Декомпозиция спектра поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Phaeodactylum tricomutum* ..... 220

## МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

- Т. Ян, Ф.С. Орехов**  
Сравнительный анализ крупнозернистого и полноатомного моделирования для оценки транспортных свойств малых молекул, белков и растворителей..... 224
- Е.Л. Гордеева, С.А. Изотова**  
Применение вейвлет-анализа для исследования распределения гидролитических ферментативных активностей в осадках..... 230
- А. Янь, М.Е. Боздаганян**  
Исследование проницаемости мембраны кожи методами крупнозернистой молекулярной динамики ..... 235

## МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Л.И. Солано Гонсалес, А. Моралес Марко, Р. Агустин Серрано, Б. Зентено Матео, А.М. Сервантес Тавера, А.А. Эрнандес Сантьяго**  
Изучение методом ДПФ электронных свойств системы доставки лекарств SE6 и 5-фторурацила..... 240
- А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина**  
Агонист рецепторов сигма-1, соединение SKF-10047, подавляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na<sup>+</sup> в эпителии кожи лягушки ..... 244
- М.Н. Шипко, А.Л. Сибирев, О.М. Масленникова, М.А. Степович**  
О возможности использования метода газоразрядной визуализации для оценки структурной организации водных растворов лекарственных средств..... 249
- Н.В. Грановский, А.А. Аносов, А.В. Ерофеев, А.Д. Мансфельд, Р.В. Беляев, А.С. Казанский**  
Основные зависимости при корреляционном измерении теплового акустического излучения ..... 255

**А.С. Титов, И.Г. Полников, С.В. Титов, К.Д. Казаринов**

Изучение физической модели биологического действия микроволнового излучения КВЧ диапазона на клеточном уровне организации биообъекта .....264

**П.В. Скворцова, А.В. Пергат, Б.И. Хайрутдинов**

Влияние противоионов на разделение фаз жидкость-жидкость в системе олигонуклеотид-пиллар[5]арен .....271

**БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ****М.И. Будник, Л.М. Апашева, Е.К. Барнашова, В.В. Ведутенко,  
Е.А. Вертикова, А.В. Грудзинский, О.Т. Касаикина, Д.А. Круговов,  
Е.Н. Овчаренко, Н.В. Пролетова, Р.А. Ростовцев, В.В. Савранский,  
А.Д. Симагин, Л.А. Смурова, К.А. Тараскин, И.В. Ущাপовский**

Инновационные методы переработки отечественного льна в целлюлозу и биотехнологические приемы его предпосевной стимулирующей обработки ..... 276

**Е.Н. Скуратовская, Т.М. Чекмарева, Н.А. Левина**

Сравнительный анализ показателей прооксидантно-антиоксидантной системы в жабрах морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 из разных акваторий г. Севастополя.....282

**П.А. Мутовкин, А.А. Мосунов, А.Д. Дегтяр**

Мониторинг изменений прототипов антиобрастающих покрытий в ходе экспонирования в морской среде.....287

## CONTENTS

### Volume 9, No. 3, 2024

#### GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS

- O.V. Basharina, A.A. Lusheva, U.S. Sekretareva, V.G. Artyukhov**  
The effect of UV radiation on the formation of complexes of bovine serum albumin with lysozyme and oleic fats acid ..... 215
- D.N. Chernyshev, V.S. Klochkova**  
Decomposition of the absorption spectrum of acetone extract of the microalgae *Phaeodactylum tricomutum* ..... 220

#### MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

- T. Yang, P.S. Orekhov**  
Comparative analysis of coarse-grained and all-atom simulations for estimating transport properties of small compounds, proteins, and solvents ..... 224
- E.L. Gordeeva, S.A. Izotova**  
The use of wavelet analysis to study the distribution of hydrolytic enzymatic activities in sediments ..... 230
- A. Yang, M.E. Bozdaganyan**  
Coarse-grained molecular dynamics simulations of the skin membrane permeability ..... 235

#### MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- L.I. Solano Gonzalez, A. Morales Marco, R. Agustin Serrano, B. Zenteno Mateo, A.M. Cervantes Tavera, A.A. Hernandez Santiago**  
Study of electronic properties by DFT of Se6 and 5-fluorouracil drug delivery system ..... 240
- A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, V.I. Badulina**  
Sigma-1 receptor agonist, compound SKF-10047, suppresses stimulative effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in frog skin epithelium ..... 244
- M.N. Shipko, A.L. Sibirev, O.M. Maslennikova, M.A. Stepovich**  
On the possibility of using the gas-discharge visualization method to assess the structural organization of aqueous solutions of drugs ..... 249
- N.V. Granovsky, A.A. Anosov, A.V. Yerofeev, A.D. Mansfeld, R.V. Belyaev, A.S. Kazansky**  
Basic dependencies in the correlation measurement of thermal acoustic radiation ..... 255

**A.S. Titov, I.G. Polnikov, S.V. Titov, K.D. Kazarinov**

Study of a physical model of the biological effect of microwave radiation in the EHF range at the cellular level of the organization of a bio-object.....264

**P.V. Skvortsova, A.V. Pergat, B.I. Khairutdinov**

Effect of counterions on liquid-liquid phase separation in the oligonucleotide-pillar[5]arene system .....271

### **BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES**

**M.I. Budnik, L.M. Apasheva, E.K. Barnashova, V.V. Vedutenko, E.A. Vertikova,  
A.V. Grudzinskiy, O.T. Kasaikina, D.A. Krugovov, E.N. Ovcharenko,  
N.V. Proletova, R.A. Rostovtsev, V.V. Savranskiy, A.D. Simagin,  
L.A. Smurova, K.A. Taraskin, I.V. Ushchapovskiy**

Innovative methods for processing domestic flax into cellulose and biotechnological methods for its pre-sowing stimulating treatment.....276

**E.N. Skuratovskaya, T.M. Chekmareva, N.A. Levina**

Comparative analysis of prooxidant-antioxidant system parameters in the gills of black scorpionfish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 from different water areas of Sevastopol .....282

**P.A. Mutovkin, A.A. Mosunov, A.D. Degtyar**

Monitoring of changes in anti-fouling coating prototypes during exposure in the marine environment.....287

## ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ЛИЗОЦИМОМ И ОЛЕИНОВОЙ ЖИРНОЙ КИСЛОТОЙ

Башарина О.В., Лушева А.А., Секретарева У.С., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская площадь, 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: utsimmerman@gmail.com

Поступила в редакцию 09.08.2024

**Аннотация.** В работе рассматривается влияние различных доз УФ-излучения на способность сывороточного альбумина образовывать комплексы с некоторыми лигандами. Показано, что добавление к раствору бычьего сывороточного альбумина (БСА) олеиновой жирной кислоты (ОЖК) приводит к снижению оптической плотности в области 300–400 нм, то есть уменьшается светорассеяние, это свидетельствует об образовании комплекса. УФ-облучение БСА в дозах 755 и 1510 Дж/м<sup>2</sup> в присутствии жирной кислоты индуцирует значительное снижение коэффициентов, характеризующих вклад светорассеяния. При взаимодействии как нативного, так и УФ-облученного БСА с олеиновой кислотой оптическая плотность в полосе поглощения белка не изменяется. При облучении УФ-светом в дозе 3020 Дж/м<sup>2</sup> происходит увеличение гидродинамического радиуса БСА, при этом увеличивается также и размер агрегатов белка. Увеличение дозы УФ-света приводит к уменьшению количества димерной формы альбумина, при этом образуются более крупные агрегаты. Добавление ОЖК не приводит к изменению данных параметров в сравнении с белком, облученным без жирной кислоты. При рассмотрении влияния УФ-света на образование комплекса БСА с лизоцимом было выявлено снижение оптической плотности в максимуме поглощения альбумина, которое имеет дозозависимый характер. С помощью метода динамического светорассеяния было обнаружено, что радиус данного комплекса увеличивается по мере увеличения дозы УФ-облучения.

**Ключевые слова:** лизоцим, бычий сывороточный альбумин, олеиновая кислота, гидродинамический радиус, оптическая плотность.

Одним из важных аспектов понимания функционального состояния организма является изучение работы транспортных белков крови. УФ-облучение широко используется в клинических и фармацевтических целях [1]. В данной статье мы исследовали влияние УФ-излучения на образование белковых комплексов на примере бычьего сывороточного альбумина. Такое взаимодействие представляет собой сложный биохимический процесс, основанный на различных типах связывания. В свою очередь, УФ-излучение приводит к фотоокислительным реакциям, что может вызывать структурные изменения в белках и влиять на их способность связываться с лигандами. Исследование структуры и размеров молекул альбумина, его взаимодействий с другими компонентами и реакция на УФ-излучение играет важную роль в понимании процессов, протекающих в организме под действием терапевтических доз УФ-света.

**Целью исследования явилось** изучение влияния УФ-облучения ( $\lambda_{\text{max}} = 254$  нм) на связывание молекул БСА с олеиновой жирной кислотой и с лизоцимом белка куриного яйца.

В качестве объектов исследования выступали растворы БСА («Sigma», США) и лизоцима («Solarbio», Китай) в конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л в 0.1 моль/л Na-фосфатном буфере (pH 7,4), олеиновой жирной кислоты (ЭКОС-1, Россия) в конечной концентрации  $4 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

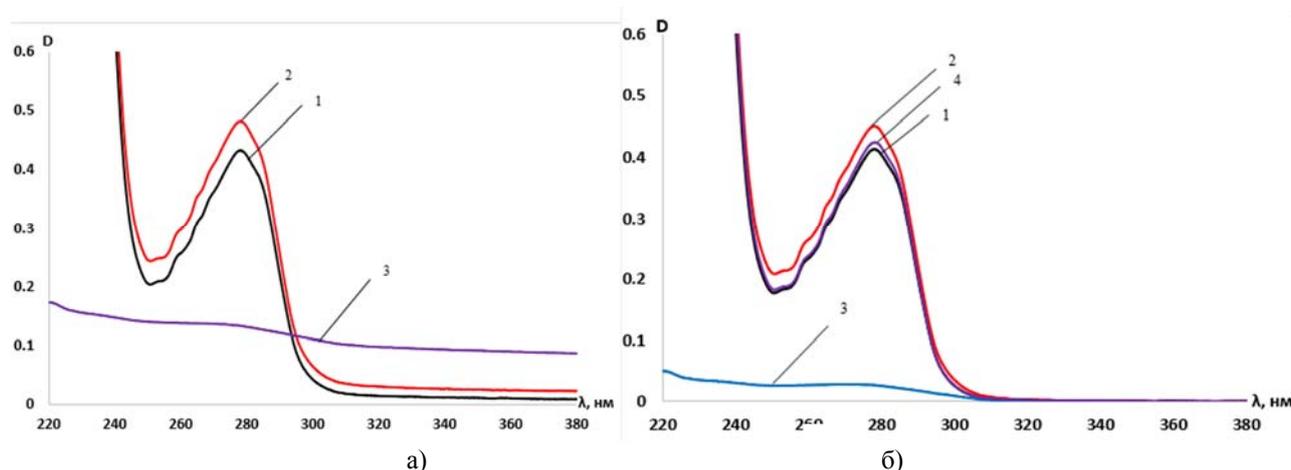
Исследуемый раствор (2 мл) облучали УФ-светом с помощью облучателя Bio-Link-BLX (Vilber Lourmat, Франция) в узком диапазоне длин волн: с  $\lambda_{\text{max}} 254$  нм в дозах: 755, 1510 и 3020 Дж/м<sup>2</sup>.

Модельные эмульсии ОЖК получали с применением ультразвукового гомогенизатора Q700, Sound Enclosure, Cup Horn & Chiller компании Qsonica (США) на частоте 22 кГц при интенсивности ультразвукового воздействия 16 Вт/см<sup>2</sup>, необходимой и достаточной для реализации максимально эффективного режима развитой кавитации в исследуемой среде. Регистрацию спектров поглощения осуществляли на спектрофотометре UV-2401 PC («Shimadzu», Япония) в режиме Slow, спектральная ширина щели 0,1 нм, шаг сканирования 0,1 нм. Гидродинамический радиус БСА определяли с помощью анализатора Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) при температуре 25 °С, коэффициент преломления 1.450, абсорбция 0.001.

Отличия в контрольных и опытных сериях экспериментов анализировали с помощью метода попарных сравнений, используя t-критерий Стьюдента в программе Stadia. Отличия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

Мы исследовали возможность образования комплекса БСА с ОЖК в нативном состоянии и после облучения исследуемой системы. Олеиновая кислота является наиболее распространенным мононенасыщенным жиром в рационе человека (~ 90% всех мононенасыщенных жиров). Транспорт высших жирных кислот кровью осуществляется в связанном состоянии – в комплексе с главным транспортным белком плазмы крови – альбумином.

ОЖК – это мононенасыщенная жирная кислота из семейства омега-9. Как и все жирные кислоты, она не поглощает свет в области 300–400 нм. На рисунке 1а мы видим относительно высокие значения оптической



**Рисунок 1.** Спектры поглощения нативного альбумина и альбумина после добавления ОЖК. а – исходные спектры, б – спектры, построенные с учетом вклада светорассеяния. Обозначения: 1 – нативный альбумин; 2 – БСА+ОЖК; 3 – ОЖК; 4 – дифференциальный спектр между комплексом БСА+ОЖК и ОЖК

плотности суспензии олеиновой кислоты в этом диапазоне длин волн, что говорит о светорассеянии после пробоподготовки, которую мы использовали в данной работе. Резкое снижение оптической плотности суспензии олеиновой кислоты после ее добавления к альбумину в области более 300 нм свидетельствует об уменьшении светорассеяния. Такие изменения спектральных свойств, вероятно, обусловлены образованием комплекса белка с жирной кислотой.

В данном случае важно количественно охарактеризовать вклад светорассеяния в полученные нами спектры поглощения.

Зависимость величины светорассеяния от длины волны описывается формулой [2]:

$$D_{\text{рас}} = 10^a \cdot \lambda^n = \frac{10^a}{\lambda^{-n}}, \quad (1)$$

где  $D_{\text{рас}}$  – оптическая плотность, обусловленная вкладом светорассеяния;

$\lambda$  – длина волны;

$a$  и  $n$  – эмпирические коэффициенты, характеризующие вклад светорассеяния.

Для определения коэффициентов  $a$  и  $n$  строили график в логарифмических координатах:

$$\lg D = f(\lg \lambda). \quad (2)$$

Истинные значения оптической плотности получали, вычитая из измеренной оптической плотности  $D_{\text{рас}}$  (рис. 1б). Нами также был построен дифференциальный спектр поглощения БСА с вычетом вклада олеиновой кислоты. Показано, что при добавлении к БСА олеиновой ЖК не происходит статистически значимого изменения оптической плотности в максимуме поглощения ( $\lambda_{\text{max}} = 278,2$  нм), тонкая структура данной полосы поглощения не изменяется. Поскольку эта полоса обусловлена электронными переходами в радикалах ароматических аминокислот, можно предположить, что в связывании БСА с олеиновой кислотой ароматические аминокислоты не участвуют.

Известно, что под действием УФ-облучения оптическая плотность спектров поглощения БСА повышается: происходит разрыв слабых связей, молекула альбумина разворачивается и занимает больший объем, следовательно, увеличивается вклад светорассеяния; при этом не происходит образования фотопродуктов ароматических аминокислот, так как не происходит сдвига длин волн электронных переходов в радикалах данных аминокислот [3]. При облучении во всех дозах нет статистически значимого изменения оптической плотности в максимуме поглощения раствора БСА+ЖК относительно облученного БСА.

Показано, что при воздействии УФ-света в дозах 755 и 3020 Дж/м<sup>2</sup> происходит увеличение значений эмпирических коэффициентов, характеризующих вклад рассеяния света. Добавление ОЖК как к нативному альбумину, так и УФ-облучение БСА в дозах 755 и 1510 Дж/м<sup>2</sup> в присутствии жирной кислоты приводит к значительному снижению данных величин (таблица 1). Видимо, отсутствие изменений данных коэффициентов при облучении образцов в дозе 3020 Дж/м<sup>2</sup> может указывать на ухудшение комплексообразования БСА с ЖК.

Нами также был измерен гидродинамический радиус молекул БСА в присутствии ОЖК. Результаты приведены в таблице 2. Известно, что радиус молекулы альбумина составляет ~ 3,5 нм. Исходя из того, что измеренный нами гидродинамический радиус нативного белка равен  $5,16 \pm 0,20$  нм, можно предположить, что в данном буферном растворе присутствует димерная форма БСА и его агрегаты.

Статистически значимое увеличение гидродинамического радиуса БСА происходит только при облучении УФ-светом в дозе 3020 Дж/м<sup>2</sup>, при этом увеличивается также и размер агрегатов белка. При увеличении дозы

Таблица 1. Количественная характеристика вклада светорассеяния

Образец	Эмпирический коэффициент			
	<i>a</i>		<i>n</i>	
	Без ОЖК	В присутствии ОЖК	Без ОЖК	В присутствии ОЖК
Нативный БСА	5,20	1,21	2,83	1,11
Воздействие УФ-света в дозе 755 Дж/м <sup>2</sup>	6,69	2,76	3,37	1,69
Воздействие УФ-света в дозе 1510 Дж/м <sup>2</sup>	4,37	2,36	2,36	2,05
Воздействие УФ-света в дозе 3020 Дж/м <sup>2</sup>	10,71	10,33	4,83	4,70

УФ-облучения происходит уменьшение количества димерной формы белка, при этом образуются более крупные агрегаты. Добавление ОЖК не приводит к изменению размеров и количества димерной формы, но уменьшается размер агрегатов в УФ-облученной системе.

Белки функционируют в биосистемах, как правило, в составе белковых комплексов. Белок-белковые взаимодействия (ББВ) - высокоспецифичные физические и химические контакты между двумя и более белками. Эти контакты образуются за счет гидрофобных взаимодействий, а также с помощью водородных и ионных связей.

Информация о ББВ важна для понимания большинства сложных молекулярных механизмов функционирования живых систем. Было показано, что молекулы альбумина и лизоцима образуют комплексы в различных стехиометрических соотношениях [4].

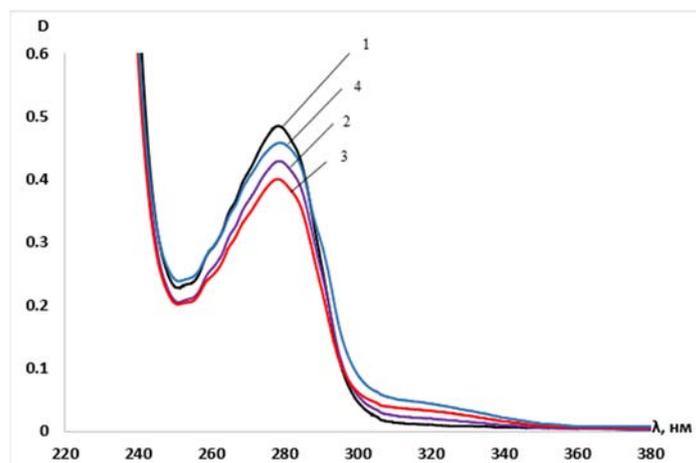
При добавлении лизоцима к БСА наблюдалось снижение оптической плотности в максимуме поглощения альбумина, что указывает на образование комплекса между молекулами данных белков. Возможно, во взаимодействии участвуют ароматические аминокислоты, чем и обусловлено снижение в полосе поглощения, обусловленной вкладом ароматических аминокислот. Воздействие УФ-света приводит к дополнительному снижению оптической плотности во всем диапазоне длин волн (рис. 2). Вероятно, в данном случае УФ-облучение способствует усилению белок-белковых взаимодействий. Исходя из степени снижения оптической плотности в ходе УФ-облучения, можно предположить, что при облучении в дозе 3020 Дж/м<sup>2</sup> фотоиндуцированные структурные изменения молекул приводят к ухудшению образования комплекса БСА-лизоцим в сравнении с действием меньших доз УФ-света.

Наблюдалось увеличение гидродинамического радиуса частиц после добавления лизоцима. У нативной формы комплекса радиус составил  $9,2 \pm 0,24$  нм (в то время как у нативного альбумина радиус димерной формы равен  $5,16 \pm 0,20$  (таблица 2). Так, в результате облучения комплекса в дозе 3020 Дж/м<sup>2</sup> было выявлено увеличение радиуса до  $10,02 \pm 0,21$  нм.

Таблица 2. Гидродинамический радиус и распределение молекул БСА и их агрегатов по размерам в растворе в присутствии олеиновой кислоты после УФ-облучения

Образец	Гидродинамический радиус, нм			
	Димерная форма		Агрегаты	
	Без ОЖК	В присутствии ОЖК	Без ОЖК	В присутствии ОЖК
Нативный БСА	$5,16 \pm 0,20$ (69)	$5,42 \pm 0,36$ (75)	$105,71 \pm 18,76$	$105,95 \pm 61,77$
Воздействие УФ-света в дозе 755 Дж/м <sup>2</sup>	$5,2 \pm 0,12$ (75)	$4,94 \pm 0,41$ (66)	$128,99 \pm 63,69$	$109,81 \pm 80,58$
Воздействие УФ-света в дозе 1510 Дж/м <sup>2</sup>	$5,38 \pm 0,24$ (56)	$4,86 \pm 0,11$ (62)	$130,39 \pm 90,0$	$81,45 \pm 55,74$
Воздействие УФ-света в дозе 3020 Дж/м <sup>2</sup>	$5,77 \pm 0,19^*$ (51)	$5,47 \pm 0,27$ (45)	$239,63 \pm 173,09^*$	$144,22 \pm 57,11$

\* - отличия от контроля (нативный БСА) статистически достоверны. В скобках приведено количественное содержание димерной формы в процентах



**Рисунок 2.** Влияние УФ-света на спектры поглощения растворов БСА в комплексе с лизоцимом. Обозначения: 1 – нативный комплекс, действие УФ-света в дозах: 2 – 755 Дж/м<sup>2</sup>, 3 – 1510 Дж/м<sup>2</sup>, 4 – 3020 Дж/м<sup>2</sup>

**Заключение.** Нами было показано, что при добавлении олеиновой ЖК к раствору БСА происходит снижение оптической плотности в области 300–400 нм, что говорит о снижении светорассеяния и свидетельствует об образовании комплекса БСА с ОЖК. При воздействии УФ-света повышается светорассеяние растворов БСА, при этом УФ-облучение БСА в дозах 755 и 1510 Дж/м<sup>2</sup> в присутствии жирной кислоты приводит к значительному снижению светорассеяния (в сравнении с альбумином, облученным в той же дозе), что может указывать на улучшение комплексообразования БСА с ОЖК. При облучении во всех исследуемых дозах не выявлено статистически значимых изменений оптической плотности в максимуме поглощения раствора БСА+ЖК относительно облученного БСА, следовательно, присутствие ОЖК не приводит к дополнительным структурным изменениям фотомодифицированных молекул БСА.

Присутствие олеиновой кислоты не приводит к изменению размеров молекул альбумина, но уменьшается размер агрегатов БСА после воздействия УФ-света.

При анализе воздействия УФ-излучения на способность альбумина образовывать комплекс с лизоцимом было выявлено, что при небольших дозах УФ-света белок-белковые взаимодействия усиливаются. Об этом говорит уменьшение оптической плотности в максимуме поглощения смеси БСА и лизоцима, радиус данного комплекса увеличивается при воздействии УФ-света.

#### Список литературы / References:

1. Маркевич П.С., Алехнович А.В., Кисленко А.М. и др. Применение ультрафиолетового излучения в современной медицине (обзор литературы). *Военно-медицинский журнал*, 2019, т. 340, №3, с. 30-36 [Markevich P.S., Alekhovich A.V., Kislenko A.M. et al. Primenenie ul'trafiioletovogo izlucheniya v sovremennoj medicine (obzor literatury). *Voенно-медицинский журнал*, 2019, vol. 340, no. 3, pp. 30-36 (In Russ.)].
2. Владимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф. *Фотобиология и спектральные методы исследования*. М., 1964, с. 212 [Vladimirov U.A., Litvin F.F. *Photobiology and spectral methods of research*. М., 1964, p. 212 (In Russ.)].
3. Башарина О.В., Артюхов В.Г., Лушева А.А., Секретарева У.С. Применение спектральных методов для изучения структурных перестроек в молекулах фотомодифицированного сывороточного альбумина. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, 2022, № 1, с. 53-59 [Basharina O.V., Artyukhov V.G., Lusheva A.A., Sekretareva U.S. Application of spectral methods to study structural rearrangements in molecules of photomodified serum albuminology and spectral methods of research. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Ximiya. Biologiya. Farmaciya*, 2022, no. 1, pp. 53-59 (In Russ.)].
4. Vasylieva M., Gromovoy T. MALDI-TOF investigation of lysozyme-albumin interaction. *Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry*, 2014, no. 9 (2), pp. 107-110.

**THE EFFECT OF UV RADIATION ON THE FORMATION OF COMPLEXES OF BOVINE SERUM ALBUMIN WITH LYSOZYME AND OLEIC FATS ACID****Basharina O.V., Lusheva A.A., Sekretareva U.S., Artyukhov V.G.**

Voronezh State University

*Universitetskaya Sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: utsimmerman@gmail.com*

Received 09.08.2024

**Abstract.** The paper examines the effect of different doses of UV radiation on the ability of serum albumin to form complexes with some ligands. It has been shown that the addition of oleic fats acid (OFA) to a solution of bovine serum albumin (BSA) leads to a decrease in optical density in the region of 300-400 nm, light scattering decreases, which indicates the formation of a complex. UV irradiation of BSA at doses of 755 and 1510 J/m<sup>2</sup> in the presence of fatty acid leads to a significant decrease in the coefficients characterizing the contribution of light scattering. When both native and UV-irradiated BSA interact with oleic acid, the optical density in the absorption band of the protein does not change. When irradiated with UV light at a dose of 3020 J/m<sup>2</sup>, the hydrodynamic radius and the size of protein aggregates also increases. An increase in the dose of UV light leads to a decrease in the amount of the dimeric form of the albumin, while larger aggregates are formed. The addition of OFA does not lead to changes in these parameters in comparison with a protein irradiated without fats acid. When considering the effect of UV light on the formation of a BSA complex with lysozyme, a decrease in optical density was revealed at the maximum of albumin absorption, while a dose-dependent decrease in optical density was observed, using the dynamic light scattering method, it was found that the radius of the complex increases with increasing UV radiation dose. When considering the effect of UV light on the formation of a BSA complex with lysozyme, a decrease in optical density in the maximum absorption of albumin was revealed, which is dose-dependent. Using the method of dynamic light scattering, it was found that the radius of this complex increases as the dose of UV radiation increases.

**Key words:** *lysozyme, bovine serum albumin, oleic acid, hydrodynamic radius, optical density.*

## ДЕКОМПОЗИЦИЯ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ АЦЕТОНОВОГО ЭКСТРАКТА МИКРОВОДОРОСЛИ *Phaeodactylum tricornutum*

Чернышев Д.Н., Ключкова В.С.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 11.08.2024

**Аннотация.** В работе проведено разделение спектров поглощения ацетонового экстракта диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* математическими моделями каротиноидов (бета-каротин, фукоксантин, диадиноксантин) и хлорофиллов (хлорофилл а, хлорофилл с) в области от 400 до 700 нм. Параллельно были вычислены концентрации пигментов стандартными методами расчета с использованием линейным уравнениям. При сравнении значений концентрации, полученных различными методами, был применен метод Блэнда-Алтмана и установлено, что все концентрации хлорофилла а, хлорофилла с, бета-каротина, фукоксантина, диадиноксантина находятся в пределах двух стандартных отклонений, что свидетельствует о согласованности измерений, полученных разными способами. Модель спектра поглощения ацетонового экстракта *Phaeodactylum tricornutum* может быть использована для быстрого определения концентраций пигментов. Реализован метод разделения спектра в программе Microsoft Excel. Вычисления, выполняющие аппроксимацию концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между спектром поглощения экстракта и его математической моделью, были выполнены при помощи табличного процессора с использованием инструмента «Поиска решения», где неизвестными величинами являются сдвиг максимумов, коэффициент уширения полос и концентрации пигментов. Предложенный способ математической обработки спектра с может быть использован как дополнительный метод определения концентрации пигментов в экстракте. Реализация данного метода позволяет наглядно оценить вклад отдельных пигментов в общий спектр поглощения.

**Ключевые слова:** *Phaeodactylum*, кривые Гаусса, каротиноиды, хлорофилл, аппроксимация, ацетоновый экстракт, спектры поглощения.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время оценка пигментного состава микроводорослей одна из актуальных задач биотехнологии. В значительной части современных исследований для определения концентрации пигментов используются спектрофотометрические методы. Стандартная биохимическая методика [1] предполагает экстракцию пигментов микроводорослей ацетоном, центрифугирование и спектрофотометрирование проб с расчётом концентрации пигментов по известным экстинкциям и линейным уравнениям.

Одним из методов количественного определения пигментов в микроводорослях является разложение спектра экстракта на математические модели отдельных пигментов. В литературе [2] предложено использовать сумму кривых нормального распределения для описания поглощения каждого пигмента. Отдельный пик был описан выражением:

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-0,5 \left( \frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

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

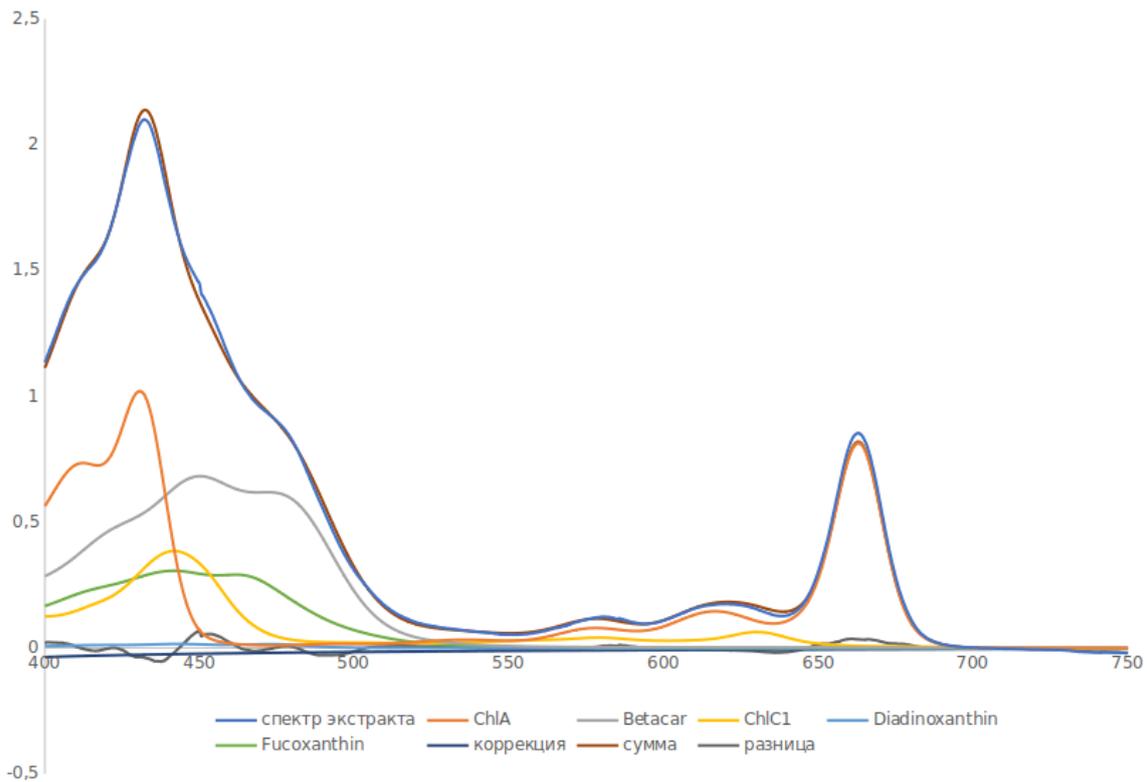
$D_{\max}$  – высота пика, отн. ед;  $\lambda_i$  – длина волны, нм;

$\lambda_{\max}$  – положение максимума пика, нм;  $\sigma$  – полуширина пика на полувысоте, нм.

В настоящей работе была выполнена декомпозиция спектра поглощения ацетонового экстракта методом приближения с использование табличного процессора MS Excel и надстройки «Поиск решения». Оптимизировалась целевая функция, а именно сумма квадратов отклонений, (стремящаяся к нулю). Поиск значений проводился методом ОПГ (общего понижающего градиента).

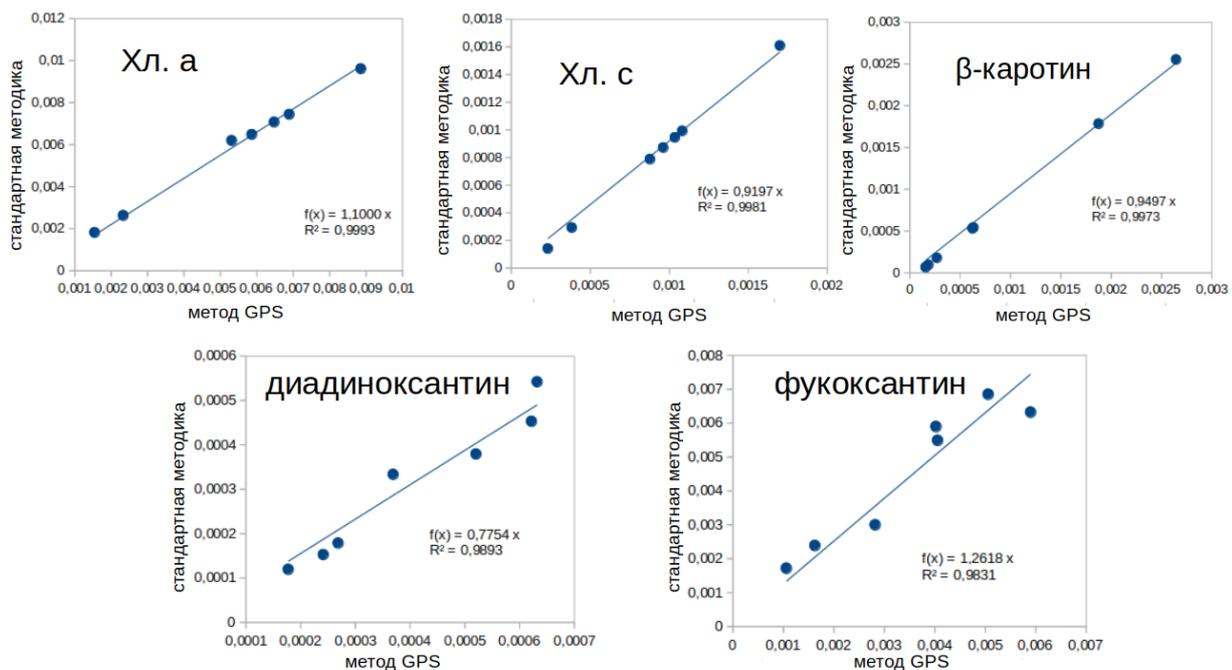
### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования в работе являлась морская диатомовая микроводоросль *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1898. Спектры поглощения культуры регистрировались в диапазоне от 400 до 750 нм с шагом 0,5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO<sub>4</sub>). Спектры поглощения экстрактов регистрировались в диапазоне от 400 до 750 нм на спектрофотометре Unicо в кварцевых 1 см кюветках в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0,5 нм.



**Рисунок 1.** Разделения спектра поглощения ацетонового экстракта *Phaeodactylum tricornerum*

Было проведено описание спектров поглощения ацетонового экстракта суммой моделей следующих пигментов: хлорофилл а, хлорофилл с, бета-каротин, фукоксантин, диадиноксантин [2] в области от 400 до 750 нм. Предложен метод математического разделения спектра поглощения ацетонового экстракта в программе Microsoft Excel. Вычисления проводились путем минимизации суммы квадратов отклонений между истинным спектром поглощения и его математической моделью. Спектр поглощения экстракта приближали с помощью математической модели, в которой неизвестными параметрами являются концентрации вышеприведенных пигментов. Так же параллельно была вычислена концентрация пигментов по линейным уравнениям согласно [1,3].



**Рисунок 2.** Концентрации хлорофиллов и каротиноидов, определённые по стандартной методике и при помощи метода разделения Гаусса

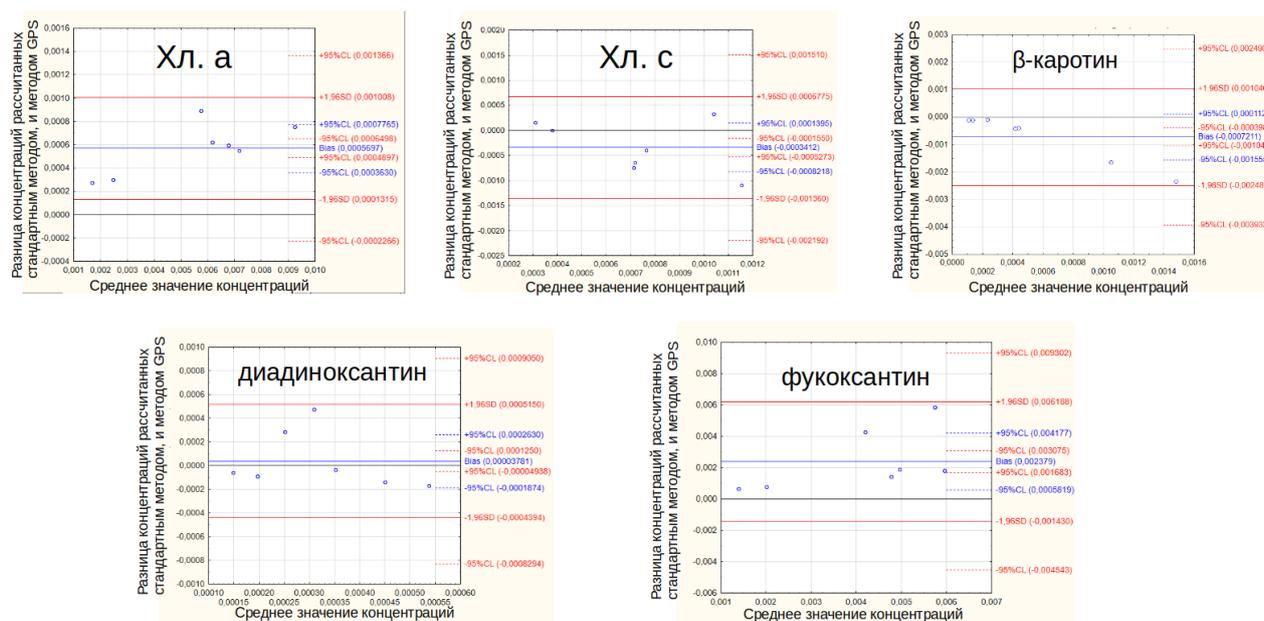


Рисунок 3. Диаграммы Блэнда-Алтмана, сравнения значений концентраций (г/л), рассчитанных по стандартной методике и методом декомпозиции спектра

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рисунке 1 представлен пример разделения спектра поглощения ацетонового экстракта *Phaeodactylum tricoratum*. Всего было обработано 7 спектров, коэффициент детерминации  $R^2$  составлял от 0,995 до 0,998, что говорит о высокой точности предлагаемой модели. Среди каротиноидов во всех экстрактах преобладал фукоксантин. Получены парные значения ( $n=7$ ) концентраций хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов, вычисленные разными методами (рис. 2).

Предложенный способ математической обработки спектра статистически не отличается от стандартной методики и может быть использован как дополнительный метод определения концентрации пигментов в экстракте. При сравнении значений концентрации, полученных различными методами, был применен метод Блэнда-Алтмана [4] (рис. 3). Было установлено, что все концентрации хлорофилла *a*, хлорофилла *c*, бета-каротина, фукоксантина, диадиноксантина находятся в пределах двух стандартных отклонений разности концентраций, что говорит о согласованности измерений, полученных разными способами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный способ математической обработки спектра статистически не отличается от стандартной методики и может быть использован как дополнительный метод определения концентрации пигментов в экстракте. Так же реализация данного метода позволяет наглядно оценить вклад отдельных пигментов в общий спектр.

### Список литературы/References:

- Carreto J.I., Catoggio J.A. An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricoratum*: Possible application to other marine algae. *Marine Biology*, 1977, vol. 40, pp. 109-116.
- Küpper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analytical chemistry*, 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 1975, vol. 167, no. 2, pp. 191-194.
- Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *International journal of nursing studies*, 2010, vol. 47, no. 8, pp. 931-936.

DECOMPOSITION OF THE ABSORPTION SPECTRUM OF ACETONE EXTRACT OF THE MICROALGAE *PHAEODACTYLUM TRICOMUTUM*

Chernyshev D.N., Klochkova V.S.

Sevastopol State University

*Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: chernishev@gmail.com*

Received 11.08.2024

**Abstract.** The paper presents the separation of absorption spectra of the acetone extract of the diatom microalga *Phaeodactylum tricomutum* using mathematical models of carotenoids (beta-carotene, fucoxanthin, diadinoxanthin) and chlorophylls (chlorophyll a, chlorophyll c) in the range from 400 to 700 nm. In parallel, pigment concentrations were calculated using standard calculation methods with the use of linear equations. When comparing the concentration values obtained by different methods, the Bland-Altman method was used and it was found that all concentrations of chlorophyll a, chlorophyll c, beta-carotene, fucoxanthin, diadinoxanthin are within two standard deviations, indicating the consistency of measurements obtained by different methods. The absorption spectrum model of the acetone extract of *Phaeodactylum tricomutum* can be used for rapid determination of pigment concentrations. The spectrum separation method was implemented in Microsoft Excel. Calculations that approximate pigment concentrations by minimizing the sum of squared deviations between the extract absorption spectrum and its mathematical model were performed using a spreadsheet processor using the "Solution Search" tool, where the unknown values are the shift of the maxima, the coefficient of band broadening, and the pigment concentrations. The proposed method of mathematical processing of the spectrum can be used as an additional method for determining the concentration of pigments in the extract. The implementation of this method allows for a visual assessment of the contribution of individual pigments to the overall absorption spectrum.

**Key words:** *Phaeodactylum*, Gaussian curves, carotenoids, chlorophyll, approximation, acetone extract, absorption spectra.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КРУПНОЗЕРНИСТОГО И ПОЛНОАТОМНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТРАНСПОРТНЫХ СВОЙСТВ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ, БЕЛКОВ И РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Ян Т., Орехов Ф.С.

Совместный университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне

ул. Международного университета, 1, г. Шэньчжэнь, 518172, Кунтай; e-mail: orekhov\_p@smbu.edu.cn

Поступила в редакцию 10.08.2024

**Аннотация.** Моделирование кинетического поведения молекулярных систем имеет важное значение для широкого спектра фундаментальных задач и приложений — от материаловедения до биофизики. В настоящей работе мы провели анализ предсказательной способности популярного крупнозернистого силового поля Martini 3 в сравнении с полноатомным моделированием молекулярной динамики для оценки коэффициентов диффузии и самодиффузии. В рамках работы, мы систематически сравнили результаты крупнозернистого и полноатомного моделирования с экспериментальными данными для ряда представляющих практический интерес систем: небольших органических молекул, водорастворимых белков и распространенных растворителей, обладающих широким спектром физико-химических свойств. Наши результаты показывают, что, предсказательная способность крупнозернистого подхода для оценки коэффициентов диффузии малых органических молекул и белков в воде сравнима с современными полноатомными силовыми полями. В тоже время, крупнозернистое силовое поле существенно уступает им в задаче предсказания самодиффузии растворителей. Мы предлагаем методологические рекомендации, позволяющие улучшить качество таких предсказаний. Работа способствует более глубокому пониманию как сильных сторон, так и ограничений крупнозернистого моделирования применительно к исследованию кинетических явлений на молекулярном уровне.

**Ключевые слова:** диффузия, коэффициент диффузии, крупнозернистые модели, молекулярная динамика.

За последние десятилетия компьютерное моделирование молекулярной динамики (МД) белков и других биологических молекул стало мощным инструментом, позволяющим исследовать динамическое поведение биологических систем с высоким временным и пространственным разрешением [1]. В частности, большое распространение подходы, базирующиеся на молекулярной динамике, получили в области поиска и разработки новых лекарственных препаратов [2], где они позволяют моделирование комплексов низкомолекулярных лигандов с их биологическими мишенями и оценивать как термодинамические [3], так и кинетические параметры [4] процессов формирования таких комплексов. Потребность в моделировании крупных биологических комплексов на больших временных масштабах привела к разработке ряда крупнозернистых (КЗ) методов, которые упрощают модели путем замены групп атомов отдельными частицами или «бусинами» (англ. «beads»). Эти методы позволяют детально исследовать динамическое поведение биологических мембран и их взаимодействие с различными низкомолекулярными соединениями [5,6], мембранные и водорастворимые белки [7,8], различные искусственные полимеры [9,10] и многих других молекулярных систем [11,12] при этом сокращая вычислительные затраты по сравнению с классическими подходами полноатомного (ПА) моделирования.

В ряде недавних работ показано, что методы крупнозернистого моделирования на базе популярного силового поля Martini 3 [13] позволяют эффективно и точно моделировать процессы формирования белок-лигандных комплексов [14,15]. Применение этого подхода, основанного на замене химических группировок из 2-4 тяжелых атомов с присоединенными к ним атомами водорода на одну крупнозернистую частицу, на ранних этапах разработки лекарственных препаратов потенциально способно значительно ускорить поиск новых перспективных молекул-кандидатов, сократить издержки, связанные с высокопроизводительными вычислениями, и предоставить исследователям детальную картину процесса связывания малых молекул с мишенями, включающую помимо оценки энергетики также и оценку кинетических параметров (в первую очередь, констант скоростей прямой и обратной реакций,  $k_{on}$  и  $k_{off}$ ), структурно-динамическую информацию о промежуточных состояниях процесса комплексообразования и их времени жизни.

В силу особенностей параметризации крупнозернистой модели Martini 3, заточенной в большей степени под точное предсказание термодинамических характеристик (свободных энергий переноса из полярной в неполярную фазу и коэффициентов распределения  $\log P$ , температур фазовых переходов в липидных системах), а не кинетических свойств (коэффициентов диффузии, вязкости) рассматриваемых молекулярных систем, а также общего «сглаживания» поверхности потенциальной энергии в силу перехода от атомного разрешения к огрубленному представлению молекул, приводящего к дополнительному «ускорению» молекулярных процессов [16], оценки последних, полученные из крупнозернистого моделирования могут значительно отличаться как от экспериментальных значений, так и от аналогичных оценок полученных из полноатомной молекулярной динамики [17]. Тем не менее, до настоящего времени не проводилось систематических исследований крупнозернистого подхода Martini 3 для оценки ключевых транспортных свойств (диффузия, вязкость, проводимость) молекул. В настоящей работе мы поставили задачу сравнить результаты вычисления

коэффициентов диффузии ряда распространенных растворителей, малых молекул и небольших водорастворимых белков с использованием крупнозернистого и полноатомного подходов.

Все расчеты, приведенные в настоящей работе, выполнялись в программном пакете Gromacs 2022.3 [18]. Подготовка систем для крупнозернистого моделирования производилась с использованием программных сценариев insane.py [19] и martinize2 [20]. Топологии малых молекул для крупнозернистого моделирования были получены из библиотеки топологий, <https://mad.ibcp.fr/>, топологии для полноатомного моделирования были получены из стандартной библиотеки топологий силового поля CHARMM36 [21], которое также использовалось и для моделирования белков. В качестве модели воды использовалась стандартная модель TIP3P [22]. Расчеты белковых систем проводились в кубических молекулярных ячейках с ребром 7 нм, для малых молекул и растворителей – в кубических ячейках с ребром 4 нм. Во всех расчетах применялись периодические граничные условия.

До проведения продуктивных расчетов в ансамбле NpT при температуре 303,15 К (термостат V-rescale,  $\tau_T=1,0$ ) и давлении 1 бар (баростат Парринелло-Рамана,  $\tau_p=5/12$  для КЗ/ПА расчетов) длиной 110 нс каждый, все системы были последовательно подвержены минимизации энергии по алгоритму градиентного спуска и уравниванию в ансамбле NVT (50 пс, термостат Берендсена) и NpT (100 пс, термостат и баростат Берендсена). Коэффициентов диффузии рассчитывались из кривой среднего квадратичного отклонения, усредненной по 20 5-нс фрагментам итоговой траектории молекулярной динамики (за вычетом первых 10 нс расчета), по формуле Эйнштейна с помощью сценариев на языке Python, использующих пакет MDAnalysis [23]:

$$D = MSD/6t, \tag{1}$$

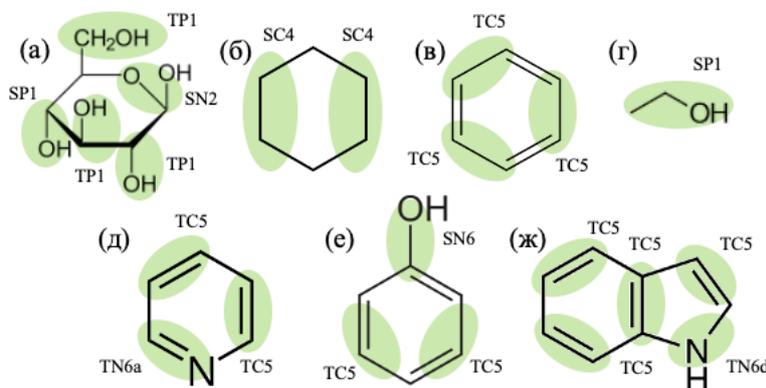
Расчеты коэффициентов самодиффузии для гомогенных систем, состоящих из чистого растворителя, проводились с использованием формулы Грина-Кубо с использованием стандартных средств Gromacs для расчета автокорреляционной функции скоростей и ее интеграла:

$$D_s = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle v(\tau)v(0) \rangle d\tau, \tag{2}$$

Протокол молекулярной динамики в этом случае отличался от протокола, использованного для расчетов малых молекул и белков. После минимизации и уравнивания, продуктивный расчет длиной проводился в ансамбле NVT для предотвращения флуктуаций позиций частиц в соответствии с рекомендациями, изложенными ранее [24] при температуре 298.15 К для прямого сравнения с доступными в литературе экспериментальными данными [25].

Для оценки диффузии малых органических молекул в настоящей работе нами был выбран ряд молекул, представляющих собой типичные фрагменты лекарствоводолюбных соединений с экспериментально измеренными коэффициентами диффузии в воде в диапазоне  $0,6 - 1,2 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$ :  $\beta$ -D-глюкоза, циклогексан, бензол, этанол, пиридин, фенол и индол. Структурные формулы выбранных соединений и соответствующие им КЗ представления приведены на рисунке 1.

Результаты расчетов, а также эталонные экспериментальные значения из литературы [26] при температуре 303,15 К приведены в таблице 1 и на рисунке 2а. Оценки, выполненные на как основе полноатомных, так и крупнозернистых расчетов, завышают значения коэффициентов диффузии рассмотренных малых молекул в 1,5-3 раза. При этом для неполярных циклогексана и бензола, оценки коэффициентов диффузии из крупнозернистых расчетов оказываются выше оценок, полученных из полноатомных расчетов, в то время как для оставшихся более полярных соединений наблюдается обратная картина и коэффициенты диффузии, полученные из полноатомных расчетов, превышают соответствующие значения, оцененные из крупнозернистых



**Рисунок 1.** Структурные формулы выбранных для оценки коэффициентов диффузии соединений и соответствующие им крупнозернистые представления (рядом с каждой крупнозернистой частицей указан соответствующий ей тип из поля Martini 3):  $\beta$ -D-глюкоза (а), циклогексан (б), бензол (в), этанол (г), пиридин (д), фенол (е) и индол (ж)

**Таблица 1.** Экспериментальные значения коэффициентов диффузии малых молекул,  $D_{\text{эксп}}$ , и оценки коэффициентов диффузии из полноатомных (ПА) и крупнозернистых (КЗ) расчетов молекулярной динамики

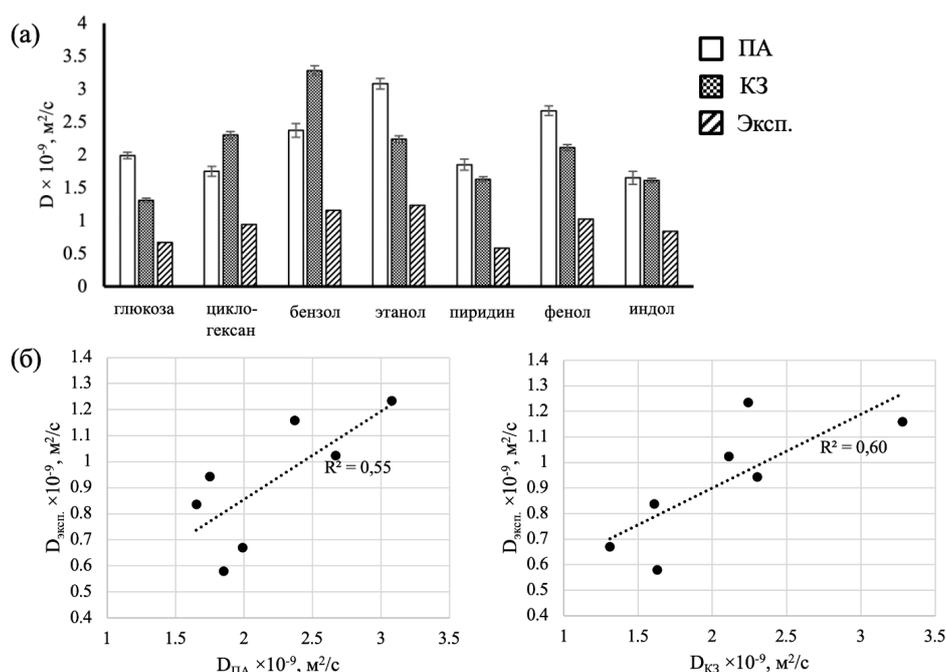
Система	$D_{\text{ПА}} \times 10^{-9}, \text{ м}^2/\text{с}$	$D_{\text{КЗ}} \times 10^{-9}, \text{ м}^2/\text{с}$	$D_{\text{эксп}} \times 10^{-9}, \text{ м}^2/\text{с}$
$\beta$ -D-глюкоза	1,99±0,05	1,31±0,03	0,67
Циклогексан	1,75±0,08	2,3±0,06	0,9435
Бензол	2,37±0,11	3,28±0,07	1,159
Этанол	3,08±0,08	2,24±0,05	1,234
Пиридин	1,85±0,08	1,63±0,04	0,58
Фенол	2,67±0,07	2,11±0,05	1,023
Индол	1,65±0,10	1,61±0,04	0,8369

расчетов, что может быть связано с несбалансированными межмолекулярными взаимодействиями между крупнозернистыми частицами, описывающими растворитель, и полярными/неполярными частицами в силовом поле Martini 3.

Хотя ни один из протестированных вычислительных подходов не оказался способен предсказать абсолютные величины коэффициентов диффузии рассмотренных в данной работе малых органических молекул в силу систематического завышения их значений, оба подхода продемонстрировали удовлетворительную корреляцию с экспериментальными значениями, причем оценки, полученные из крупнозернистых расчетов согласуются лучше (в незначительной степени) с экспериментальными данными (коэффициент детерминации  $R^2=0,55$  и  $0,60$  для полноатомных и крупнозернистых расчетов, соответственно, см. рис. 2б).

Нами также были проведены оценки коэффициентов диффузии для небольших модельных водорастворимых белков: убиквитина человека (структура в базе данных PDB 1UBQ, молекулярная масса 8,6 кДа) и лизоцима курицы (структура в базе данных PDB 1AKI, молекулярная масса 14,3 кДа). Как видно из таблицы 2, коэффициенты диффузии, рассчитанные из траекторий полноатомной и крупнозернистой молекулярной динамики, хорошо согласуются между собой для обоих белков. Также, величины для лизоцима близки к экспериментально известному коэффициенту диффузии в воде для этого белка [27].

Наконец, мы также провели оценку коэффициентов самодиффузии из полноатомных и крупнозернистых расчетов для трех распространенных растворителей: воды, бензола и октанола, используя как ранее примененный подход к оценке коэффициентов диффузии из соотношения Эйнштейна (1), так и альтернативный подход, базирующийся на вычислении автокорреляционной функции скоростей молекул и применении формулы Грина-Кубо (2). Для всех трех рассмотренных растворителей оба метода расчета коэффициентов диффузии (по формуле Эйнштейна и формуле Грина-Кубо) привели к очень близким результатам (табл. 3). Однако, в данном случае



**Рисунок 2.** (а) Сравнение значений коэффициентов диффузии для малых органических молекул, рассчитанных на основе полноатомных (ПА) и крупнозернистых (КЗ) расчетов молекулярной динамики, и экспериментальных величин; (б) корреляция величин коэффициентов диффузии из полноатомных (слева) и крупнозернистых (справа) расчетов с экспериментальными значениями

**Таблица 2.** Значения коэффициентов диффузии для водорастворимых белков, полученные из полноатомных (ПА) и крупнозернистых (КЗ) расчетов молекулярной динамики

Система	Модель	$D, \times 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$
Убиквитин	ПА	1,18±0,04
	КЗ	1.19±0,03
Лизоцим	ПА	0,904±0,03
	КЗ	0,763±0,02
	Эксперимент	1,12

лишь оценки, полученные из полноатомных расчетов, относительно хорошо согласуются с экспериментальными величинами коэффициентов самодиффузии: минимальное расхождение обнаружено для октанола (менее 15% для расчетов на базе соотношения Эйнштейна), для воды и бензола разница между экспериментальными данными и результатами полноатомных расчетов составляет порядка 1,5-2 раз в сторону переоценки расчетных коэффициентов диффузии.

Расхождение между результатами крупнозернистого моделирования и экспериментальными величинами коэффициентов самодиффузии растворителей оказались намного сильнее. Причем, коэффициент самодиффузии «крупнозернистой» воды оказывается намного меньше (примерно в 15 раз) по сравнению с экспериментальным значением, в то время как для двух других растворителей, бензола и октанола, крупнозернистое моделирование, наоборот, завышает значения коэффициентов самодиффузии примерно в 2-5 раз. Такое необычное поведение крупнозернистой модели воды можно связать с большой массой частиц, описывающих воду в силовом поле Martini 3, которые интегрально соответствуют сразу 4 молекулам воды и имеют массу 40 Да, в связи с чем, вероятно, диффузия таких частиц происходит существенно медленнее.

На основе последнего наблюдения, можно сформулировать рекомендацию по изменению массы частиц «крупнозернистой воды» в расчетах с применением силового поля Martini 3 на меньшие значения, особенно в задачах, где корректное описание диффузии растворителя является критическим. Кроме того, ускорение диффузии растворителя за счет изменения массы соответствующих ему частиц можно рассматривать как один из подходов, позволяющих ускорять обход конфигурационного пространства при расчетах молекулярной динамики. В задачах, где, с одной стороны, количественные оценки коэффициентов диффузии не являются важными, но, одновременно с этим, требуется ускорить протекание таких процессов, как формирование белок-белковых и белок-лигандных комплексов [28], такой подход может быть особенно продуктивен, как следует из недавних результатов, полученных для модифицированной полноатомной модели воды TIP3P-F [29] с меньшей молекулярной массой.

В настоящей работе мы систематически сравнили результаты, полученные в результате моделирования в крупнозернистом силовом поле Martini 3, с результатами, полученными из полноатомного моделирования, и экспериментальными данными, для ряда представляющих практический интерес систем, включая небольшие органические молекулы и распространенные растворители, обладающих широким спектром физико-химических свойств. Наши результаты показывают, что, предсказательная способность крупнозернистого подхода для оценки коэффициентов диффузии малых органических молекул и водорастворимых белков в воде сравнима с современными полноатомными силовыми полями. В тоже время, крупнозернистое моделирование существенно уступает им в задаче предсказания самодиффузии растворителей. Мы также указываем на возможное решение

**Таблица 3.** Значения коэффициентов самодиффузии для распространенных растворителей, полученные из полноатомных (ПА) и крупнозернистых (КЗ) расчетов молекулярной динамики по формулам Эйнштейна,  $D_E$ , и Грина-Кубо,  $D_{Г-К}$ , а также известные экспериментальные значения

Система	Модель	$D_E, \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$	$D_{Г-К}, \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$	Эксперимент
Вода	ПА	5,51±0,15	5,51±0,02	2,300
	КЗ	0,13±0,10	0,15±0,01	
Бензол	ПА	2,07±0,24	2,05±0,01	1,159
	КЗ	5,80±0,33	5,47±0,01	
Октанол	ПА	0,12±0,11	0,27±0,01	0,142
	КЗ	2,82±0,27	2,50±0,01	

этой проблемы за счет изменения стандартного значения молекулярной массы частиц растворителя в крупнозернистом силовом поле.

#### Список литературы / References:

1. Hollingsworth S.A., Dror R.O. Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 2018, vol. 99, no. 6, pp. 1129-1143, doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011.
2. Borhani D.W., Shaw D.E. The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *Journal of computer-aided molecular design*, 2012, vol. 26, pp. 15-26, doi: 10.1007/s10822-011-9517-y.
3. Bernardi R.C., Melo M.C., Schulten K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2015, vol. 1850, no. 5, pp. 872-877, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.019.
4. Decherchi S., Cavalli A. Thermodynamics and kinetics of drug-target binding by molecular simulation. *Chemical Reviews*, 2020, vol. 120, no. 23, pp. 12788-12833, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00534.
5. Orekhov P.S., Kholina E.G., Bozdaganyan M.E., Nesterenko A.M., Kovalenko I.B., Strakhovskaya M.G. Molecular mechanism of uptake of cationic photoantimicrobial phthalocyanine across bacterial membranes revealed by molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2018, vol. 122, no. 14, pp. 3711-3722, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b11707.
6. Kholina E.G., Kovalenko I.B., Bozdaganyan M.E., Strakhovskaya M.G., Orekhov P.S. Cationic antiseptics facilitate pore formation in model bacterial membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2020, vol. 124, no. 39, pp. 8593-8600, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c07212.
7. Kuzmin A., Orekhov P., Astashkin R., Gordeliy V., Gushchin I. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2022, vol. 90, no. 5, pp. 1102-1114, doi: 10.1002/prot.26317.
8. Orekhov P.S., Klose D., Mulkidjanian A.Y., Shaitan K.V., Engelhard M., Klare J.P., Steinhoff H.J. Signaling and adaptation modulate the dynamics of the photosensory complex of *Natronomonas pharaonis*. *PLoS Computational Biology*, 2015, vol. 11, no. 10, e1004561, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004561.
9. Orekhov P.S., Bozdaganyan M.E., Voskoboynikova N., Mulkidjanian A.Y., Steinhoff H.J., Shaitan K.V. Styrene/maleic acid copolymers form SMALPs by pulling lipid patches out of the lipid bilayer. *Langmuir*, 2019, vol. 35, no. 10, pp. 3748-3758, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b03978.
10. Voskoboynikova N., Orekhov P., Bozdaganyan M., Kodde F., Rademacher M., Schowe M., Budke-Giesecking A., Brickwedde B., Psathaki O.E., Mulkidjanian A.Y., Cosentino K. Lipid dynamics in diisobutylene-maleic acid (Dibma) lipid particles in presence of sensory rhodopsin ii. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no. 5, p. 2548, doi: 10.3390/ijms22052548.
11. Alessandri R., Grunewald F., Marrink S.J. The martini model in materials science. *Advanced Materials*, 2021, vol. 33, no. 24, p. 2008635, doi: 10.1002/adma.202008635.
12. Marrink S.J., Monticelli L., Melo M.N., Alessandri R., Tieleman D.P., Souza P.C. Two decades of Martini: Better beads, broader scope. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2023, vol. 13, no. 1, e1620, doi: 10.1002/wcms.1620.
13. Souza P.C., Alessandri R., Barnoud J., Thallmair S., Faustino I., Grunewald F., Patmanidis I., Abdizadeh H., Bruininks B.M., Wassenaar T.A., Kroon P.C. Martini 3: a general purpose force field for coarse-grained molecular dynamics. *Nature methods*, 2021, vol. 18, no. 4, pp. 382-388, doi: 10.1038/s41592-021-01098-3.
14. Souza P.C., Thallmair S., Conflitti P., Ramirez-Palacios C., Alessandri R., Raniolo S., Limongelli V., Marrink S.J. Protein-ligand binding with the coarse-grained Martini model. *Nature communications*, 2020, vol. 11, no. 1, p. 3714, doi: 10.1038/s41467-020-17437-5.
15. Souza P.C., Limongelli V., Wu S., Marrink S.J., Monticelli L. Perspectives on high-throughput ligand/protein docking with Martini MD simulations. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, vol. 8, p. 657222, doi: 10.3389/fmolb.2021.657222.
16. Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S., Tieleman D.P., De Vries A.H. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The journal of physical chemistry B*, 2007, vol. 111, no. 27, pp. 7812-7824, doi: 10.1021/jp071097f.
17. Periolo X., Marrink S.J. The Martini coarse-grained force field. *Biomolecular simulations: Methods and protocols*, 2013, pp. 533-565, doi: 10.1007/978-1-62703-017-5\_20.
18. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Pall S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 2015, vol. 1, pp. 19-25, doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
19. Wassenaar T.A., Ingolfsson H.I., Bockmann R.A., Tieleman D.P., Marrink S.J. Computational lipidomics with insane: a versatile tool for generating custom membranes for molecular simulations. *Journal of chemical theory and computation*, 2015, vol. 11, no. 5, pp. 2144-2155, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00209.
20. Kroon P.C., Grunewald F., Barnoud J., van Tilburg M., Souza P.C., Wassenaar T.A., Marrink S.J. Martinize2 and Vermouth: Unified Framework for Topology Generation. *eLife*, 2023, vol. 12, doi: 10.7554/eLife.90627.2.
21. Huang J., MacKerell Jr A.D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of computational chemistry*, 2013, vol. 34, no. 25, pp. 2135-2145, doi: 10.1002/jcc.23354.

22. Price D.J., Brooks III C.L. A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation. *The Journal of chemical physics*, 2004, vol. 121, no. 20, pp. 10096-10103, doi: 10.1063/1.1808117.
23. Michaud-Agrawal N., Denning E.J., Woolf T.B., Beckstein O. MDAAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry*, 2011, vol. 32, no. 10, pp. 2319-2327, doi: 10.1002/jcc.21787.
24. Maginn E.J., Messerly R.A., Carlson D.J., Roe D.R., Elliot J.R. Best practices for computing transport properties 1. Self-diffusivity and viscosity from equilibrium molecular dynamics [article v1. 0]. *Living Journal of Computational Molecular Science*, 2019, vol. 1, no. 1, p. 6324, doi: 10.33011/livecoms.1.1.6324.
25. Wang J., Hou T. Application of molecular dynamics simulations in molecular property prediction II: diffusion coefficient. *Journal of computational chemistry*, 2011, vol. 32, no. 16, pp. 3505-3519, doi: 10.1002/jcc.21939.
26. Yaws C.L. Diffusion coefficient in water-organic compounds. In *Transport properties of chemicals and hydrocarbons*. William Andrew Publishing, 2009, pp. 502-593.
27. Young M.E., Carroad P.A., Bell R.L. Estimation of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnology and bioengineering*, 1980, vol. 22, no. 5, pp. 947-955, doi: 10.1002/bit.260220504.
28. Andreev G., Kovalenko M., Bozdaganyan M.E., Orekhov P.S. Colabind: A Cloud-Based Approach for Prediction of Binding Sites Using Coarse-Grained Simulations with Molecular Probes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2024, vol. 128, no. 13, pp. 3211-3119, doi: 10.1021/acs.jpcc.3c07853.
29. Jimenez J.G., Fabian B., Hummer G. Faster Sampling in Molecular Dynamics Simulations with TIP3P-F Water. *ChemRxiv*, 2024, doi: 10.26434/chemrxiv-2024-sz6v9.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF COARSE-GRAINED AND ALL-ATOM SIMULATIONS FOR ESTIMATING TRANSPORT PROPERTIES OF SMALL COMPOUNDS, PROTEINS, AND SOLVENTS

Yang T., Orekhov P.S.

Shenzhen MSU-BIT University

International University park, road 1, Shenzhen, 518172, China; e-mail: orekhov\_p@smbu.edu.cn

Received 10.08.2024

**Abstract.** Modeling the kinetic behavior of molecular systems is of a paramount importance for a wide range of fundamental problems and applications, from materials science to biophysics. Here, we analyzed the performance of the popular coarse-grained force field Martini 3 in comparison with all-atom molecular dynamics simulations for estimating diffusion and self-diffusion coefficients. We systematically compared the results of coarse-grained and all-atom simulations with experimental data for a number of systems, which possess a practical interest: small organic molecules, water-soluble proteins, and common solvents with a wide range of physicochemical properties. Our results show that the ability of the coarse-grained approach to estimate the diffusion coefficients of small organic compounds and proteins in water is comparable to that of modern all-atom force fields. At the same time, the coarse-grained force field is significantly inferior to them in the task of predicting solvent self-diffusion. We propose methodological recommendations to improve the quality of such predictions. The work contributes to a deeper understanding of both the strengths and limitations of coarse-grained modeling as applied to the study of kinetic phenomena at the molecular level.

**Key words:** diffusion, diffusion coefficient, coarse-grained model, molecular dynamics.

## ПРИМЕНЕНИЕ ВЕЙВЛЕТ-АНАЛИЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АКТИВНОСТЕЙ В ОСАДКАХ

Гордеева Е.Л.<sup>1</sup>, Изотова С.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

Миусская площадь, 9, г. Москва, 125047, РФ; e-mail: Elena.Gordeeva311@yandex.ru

<sup>2</sup> Московский автомобильно-дорожный государственный технический университет (МАДИ)

Ленинградский проспект, 64, г. Москва, 125319, РФ

Поступила в редакцию 10.08.2024

**Аннотация.** В работе приведены результаты применения вейвлетов для исследования особенностей распределения гидролитических ферментативных активностей в донных осадках. В качестве исходных данных были использованы величины потенциально возможных активностей ферментов – протеазы и амилазы, измеренные на различных горизонтах двух колонок осадков, полученных в Норвежском (станция 1084) и Баренцевом (станция 987) морях. При проведении анализа в качестве базисных функций были выбраны вейвлеты Морле. На основе полученных спектрограмм для станции 1084 выявлена связь изменчивости распределения по горизонтам колонок как протеазной, так и для амилазной активностей с типом осадка, однако структура спектрограмм различна. И для протеазной, и для амилазной активности выявлены структуры, связанные с самоподобием распределения и наличием периодичности в данных. На спектрограмме протеазной активности осадка со станции 987 крупномасштабные минимумы отражают изменение типа осадка в колонке (гранулометрического состава, содержания песчано-гравийного материала, слоистости и т.д.), что подтверждает гипотезу о взаимосвязи величин протеазной активности и типа осадка. На вейвлет-спектрограмме для амилазной активности выделяется область локальных высокочастотных максимумов, связанных с изменением климата – начавшимся потеплением. При сравнении двух спектрограмм выявлена противофазность в распределении активностей, что может быть связано с разным видом ограниченного вещества – источника ферментов. Таким образом, проведённый вейвлет-анализ выявил особенности распределений и может являться дополнением к обычным методам анализа данных и их статистической обработки.

**Ключевые слова:** гидролитические ферментативные активности, вейвлет, спектрограмма.

В настоящее время вейвлет-анализ широко используется для обработки сложных сигналов различной природы. В обзоре [1] авторами приведены различные примеры современного практического использования аппарата вейвлетов, причём отмечено, что эти методы очень востребованы в области наук о Земле как для анализа изменчивости характеристик процессов, выявления периодичности в данных, так и для пространственно-временной корреляции сигналов.

В данной статье приведены примеры использования вейвлетов для анализа распределения гидролитических ферментативных активностей в колонках донных осадков Норвежского и Баренцева морей. Пробы осадков были получены в 11-ом и 12-ом рейсах НИС «Академик Сергей Вавилов» летом и осенью 1997 года, и их подробное описание приведено в отчётах по этим рейсам [2-3]. Донные осадки отбирали с помощью грунтовой трубки. Величины потенциально возможных активностей ферментов – протеазы и амилазы на различных горизонтах были измерены Г.А. Корнеевой с использованием методов анализа, разработанных в институте океанологии РАН им. П.П. Ширшова [4].

Продуцируемые микроорганизмами внеклеточные гидролитические ферменты активно действуют в компонентах экосистем, обеспечивая деструкцию высокомолекулярных органических соединений для последующей утилизации продуктов гидролиза, являясь высокоэффективными природными катализаторами. При этом способность ферментов прикрепляться к минеральной поверхности обеспечивает их сохранение в среде обитания, в том числе в донных осадках, поэтому величины гидролитических ферментативных активностей могут служить источником информации о климатических условиях формирования осадков, а также о продуктивности исследуемых районов. Распределения гидролитических ферментативных активностей в донных осадках имеют сложную структуру, так как величины активностей отражают влияние многочисленных параметров среды, которые не всегда могут быть выявлены и количественно измерены.

В работе [5] приведены результаты измерения величин активностей протеазы и амилазы в колонках донных осадков Норвежского моря, а также результаты статистической обработки этих данных. Для моделирования пространственной изменчивости ферментативной активности по глубине осадка и выявления особенностей распределения были использованы автокорреляционные функции. Следует отметить, что эта задача является достаточно сложной и, несмотря на то, что представленная в статье смешанная модель авторегрессии первого порядка – скользящего среднего первого порядка адекватно описывает результаты, для получения более информативной модели в данной статье была предпринята попытка описать эти данные с помощью вейвлетов.

На рисунке 1 показано вертикальное распределение протеазной и амилазной активностей в колонке донных осадков, полученной на станции 1084 (координаты: 67°32'5" с. ш., 1°31'8" в. д.) в восточной части Норвежского

моря [3]. Мощность изученной колонки составила 230 см. Отборы проб для анализов проводились через каждые 5 см.

Анализ изменчивости активностей по глубине осадка показывает отсутствие явной трендовой составляющей и позволяет предположить наличие скрытых периодичностей в данных. Для выявления закономерностей распределения ферментативных активностей и установления возможных связей с характеристиками осадков был использован аппарат вейвлет-анализа.

Вейвлет-анализ основан на вейвлет-преобразовании, которое заключается в разложении сигнала по базису, сконструированному из обладающей определенными свойствами солитоноподобной функции-вейвлета  $\psi(t)$ , посредством масштабных изменений и переносов. Каждая из функций этого базиса характеризует как определенную пространственную (временную) частоту, так и ее локализацию в физическом пространстве.

В данной работе было использовано непрерывное вейвлет-преобразование, спектр коэффициентов которого  $C(a, b)$  вычисляется по формуле:

$$C(a, b) = |a|^{-1/2} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \Psi^*((t - b)/a) dt, \quad (1)$$

где:

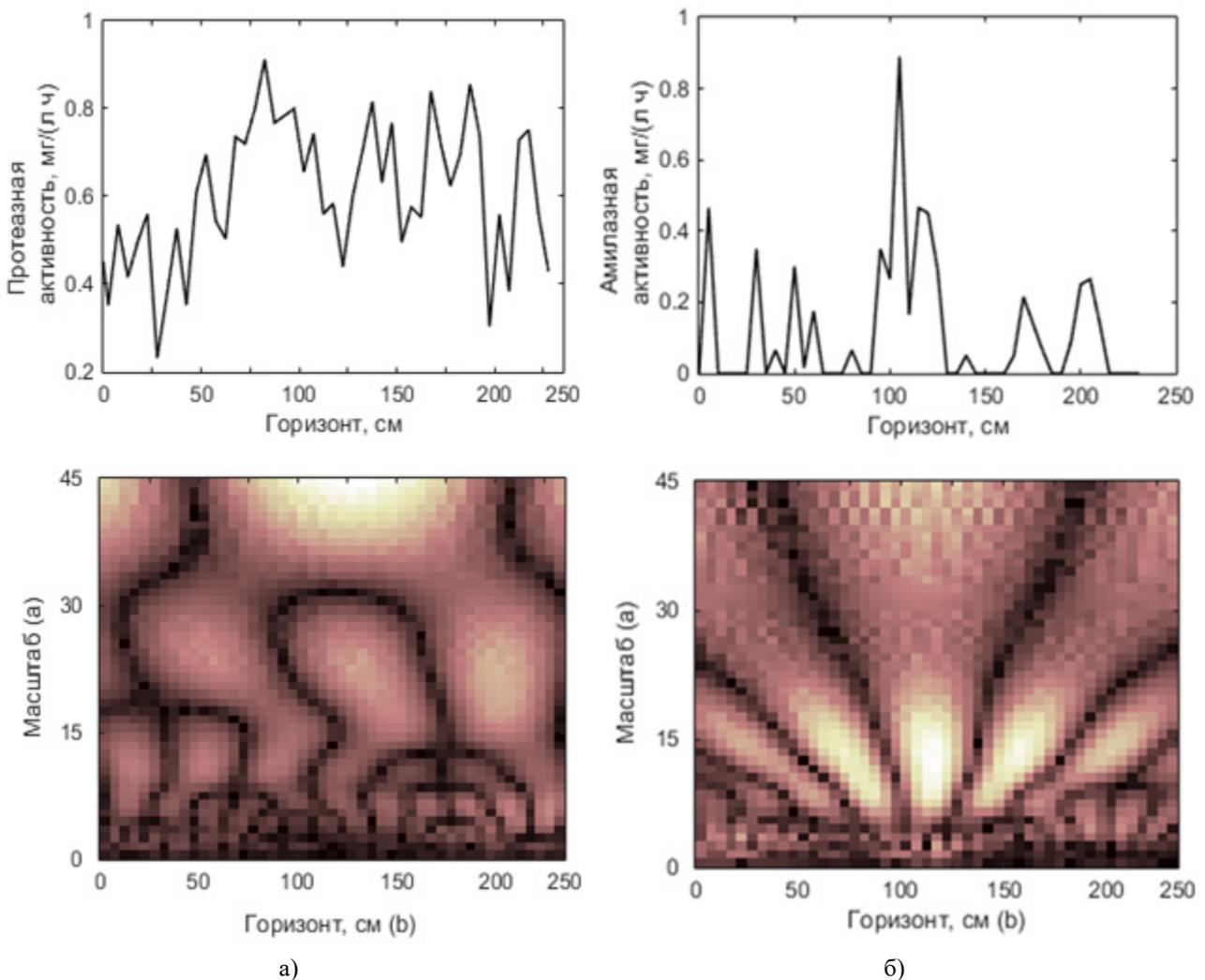
$f(t)$  – сигнал,

$a$  – масштабный коэффициент, определяющий величину растяжения вейвлета,

$b$  имеет размерность времени и определяет величину сдвига вейвлет-функции, символ \* обозначает комплексное сопряжение.

При проведении вейвлет-анализа вместо использования коэффициентов как масштаб времени и время, в статье применяются расстояние (горизонт) и отрезки.

В качестве базисных функций были выбраны вейвлеты Морле  $\psi(x) = \cos(5x) \cdot \exp(-x^2/2)$ , которые хорошо приспособлены для исследования процессов, содержащих периодические составляющие.



**Рисунок 1.** Распределение и вейвлет-спектрограмма протеазной (а) и амилазной (б) активностей в колонке донного осадка станции 1084

Вычисления проводились в пакете MATLAB с использованием функции непрерывного вейвлет-преобразования

$$cwt(x, y, \dots, 'morl', 'plot'), \quad (2)$$

где:

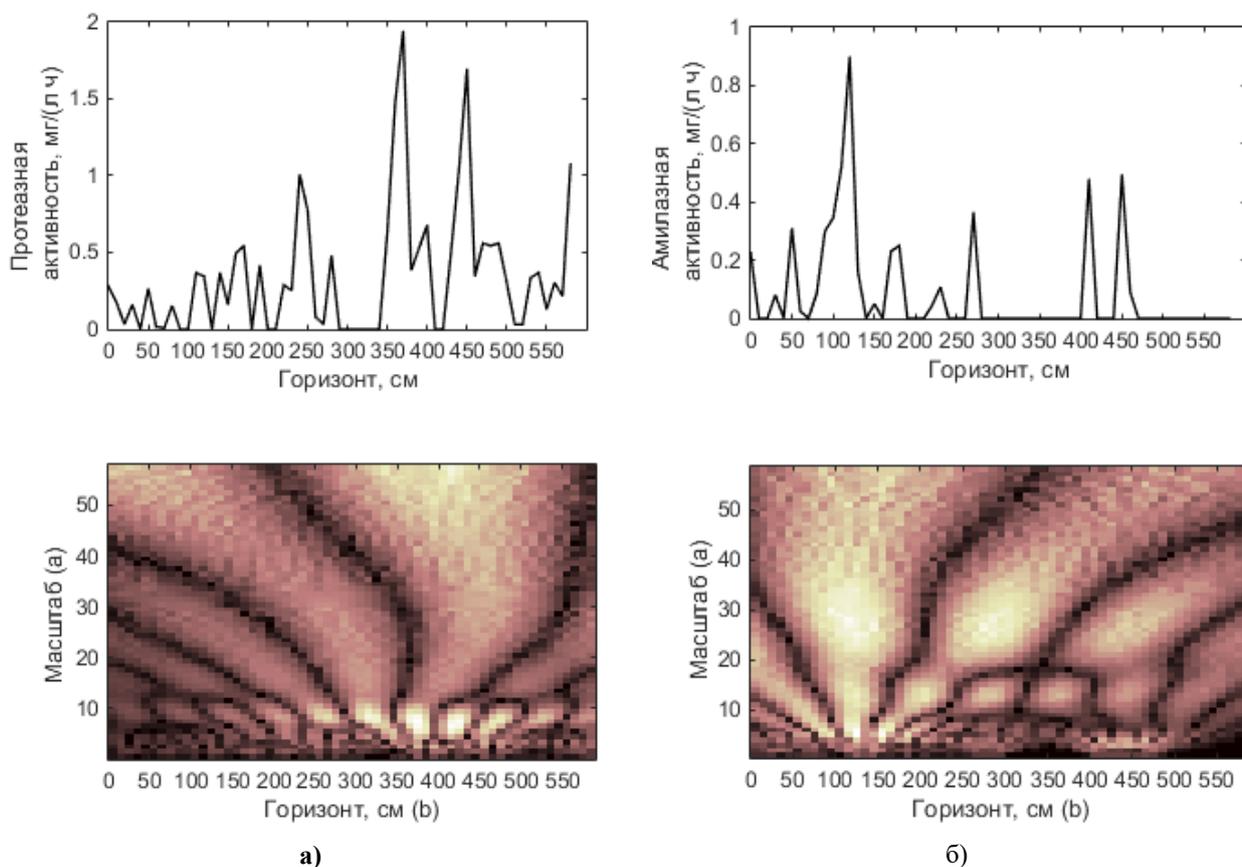
- $x$  – входной сигнал,
- $y$  – масштаб вейвлета,
- 'morl' – вид вейвлет-функции,
- 'plot' – функция графического вида решения.

На рисунке 1 показаны картины значений коэффициентов вейвлет-преобразования для протеазной и амилазной активностей: по оси абсцисс отложен параметр сдвига, по оси ординат – пространственный масштаб (или частота). Светлые области на графике соответствуют положительным, а темные отрицательным значениям  $C(a, b)$ , оттенками серого цвета в каждой из областей выделены диапазоны  $C(a, b)$ . Значение амплитуды вейвлет-преобразования в точке  $(a_0, b_0)$  тем больше по абсолютной величине, чем сильнее корреляция между вейвлетом данного масштаба и поведением сигнала в окрестности  $x = b_0$ .

На вейвлет-спектрограмме распределения протеазной активности отмечается появление «вилочек», где происходит раздвоение локальных максимумов, причём это наблюдается на всём расстоянии. Это может говорить о самоподобии распределения и некоторой периодичности сигнала. Отмечается также наличие двух глобальных минимумов на горизонте 20 и 210 см, а также небольшого максимума на 70 см. Оба глобальных минимума получатся там, где в колонке происходит изменение типа осадка, а глобальный максимум на низкой частоте приходится на слой осадка между горизонтами 80 и 190 см, что соответствует осадкам, содержащим обломки пород айсбергового разноса и приурочены к ледниковым эпохам и межледниковьям.

В вейвлет-спектрограмме распределения амилазной активности также отмечается некоторая фрактальность распределения на высоких частотах, и на расстоянии от 50 до 170 см область максимумов. Можно предположить, что амилазная активность также связана с типом осадка.

На рисунке 2 показано вертикальное распределение протеазной и амилазной активностей в колонке донных осадков станции 987 (координаты:  $76^{\circ}12,25'$  с.ш.,  $62^{\circ}29,19'$  в.д.), полученной в заливе Русская Гавань Северного острова Новой Земли в Баренцевом море [3]. Мощность изученной колонки составила 580 см, что охватывает примерно 800 лет, с конца XII в. до наших дней. Отборы проб для анализов проводились через каждые 10 см.



**Рисунок 2.** Распределение и вейвлет-спектрограмма протеазной (а) и амилазной (б) активностей в колонке донного осадка станции 987

На вейвлет-спектрограмме для протеазной активности наблюдается группа максимумов, соответствующих слою осадка 330–470 см. Возраст осадка в этой области измеряется 1470–1350 гг. [6]. В этот период произошло резкое увеличение скорости осадконакопления, связанное с выдвиганием ледника в акваторию Русской Гавани. Крупномасштабные минимумы на спектрограмме отражают изменение типа осадка в колонке (гранулометрического состава, содержания песчано-гравийного материала, слоистости и т.д.), что подтверждает гипотезу о взаимосвязи величин протеазной активности и типа осадка.

На вейвлет-спектрограмме для амилазной активности выделяется область локальных высокочастотных максимумов в слое осадка 70–150 см, что соответствует возрасту осадка 1940–1750 гг. Это совпадает с поздней стадией малого ледникового периода и начавшимся потеплением. На спектрограмме выделяются области вытянутых максимумов с наклоном вправо, что отражает перераспределение энергии по другим масштабам в область низких частот.

Следует отметить, что на вейвлет-спектрограммах для станции 987 отмечается некоторая противозональность в распределении гидролитических ферментативных активностей. Это может быть связано с тем, что при формировании осадков происходило захоронение разных видов органического вещества – источника ферментов.

Таким образом, использование вейвлетов для анализа распределения гидролитических ферментативных активностей для двух колонок донных осадков позволило выявить локальные особенности распределений, обнаружить периодичности в данных, а также отметить связь значений ферментативных активностей с типом осадка. Вейвлет-анализ может являться дополнением к обычным методам анализа данных и их статистической обработки.

#### **Список литературы / References:**

1. Фрик П.Г., Соколов Д.Д., Степанов Р.А. Вейвлет-анализ пространственно-временной структуры физических полей. *Успехи физических наук*, 2022, № 1 [Frick P.G., Sokolov D.D., Stepanov R.A. Wavelet analysis of the space-time structure of physical fields. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*, 2022, no. 1, doi: 10.3367/UFNr.2020.10.038859 (In Russ.)].
2. Иванов Ю.А. Отчет о работе экспедиции 11-го рейса НИС “Академик Сергей Вавилов” 27 августа - 15 октября 1997 г. *Архив ИО РАН*, 1997 [Ivanov Yu.A. Report on the work of the expedition of the 11th flight of the scientific research ship “Academician Sergey Vavilov” August 27 - October 15, 1997. *Archive of the IO RAS*, 1997 (In Russ.)].
3. Богданов Ю.А. Отчет о работе экспедиции 12-го рейса НИС “Академик Сергей Вавилов” 25 октября - 10 ноября 1997 г. *Архив ИО РАН*, 1997, 240 с. [Bogdanov Yu.A. Report on the expedition of the 12th flight of the scientific research ship “Academician Sergey Vavilov” October 25 - November 10, 1997. *Archive of the IO RAS*, 1997, 240 p. (In Russ.)].
4. Харченко С.В., Корнеева Г.А., Ветров А.А., Романкевич Е.А. Способ оценки биологической активности органических соединений в водных растворах. Авт. Свидетельство № 1605206 от 8 июля 1990 г. 07.11.90. Бюл. № 41 [Kharchenko S.V., Korneeva G.A., Vetrov A.A., Romankevich E.A. A method for evaluating the biological activity of organic compounds in aqueous solutions. Auth. Certificate No. 1605206 dated July 8, 1990 07.11.90. Byul. No. 41 (In Russ.)].
5. Корнеева Г.А., Гордеева Е.Л. Гидролитические ферментативные активности в колонках донных осадков Норвежского моря и статистический анализ их распределения. *Известия АН. Серия биологическая*, 2004, № 1, DOI: 1062-3590/04/3101-0091. [Korneeva G.A., Gordeeva E.L. Hydrolytic enzyme activities in bottom sediment cores from the Norwegian Sea and statistical analysis of their distribution. *Izvestiya Akademiya Nauk, Seriya Biologicheskaya*, 2004, no. 1. (In Russ.)]
6. Мурдмаа И.О., Иванова Е.В. и др. Малый ледниковый период в Русской Гавани (Северный Остров Новой Земли). В сб. *Актуальные проблемы океанологии*. М.: Наука, 2003 [Murdmaa I.O., Ivanova E.V. and others. The little ice age in the Russian Harbor (The Northern Island of Novaya Zemlya). *Aktualnie problemi okeanologii*. М.: Nauka, 2003 (In Russ.)].

## THE USE OF WAVELET ANALYSIS TO STUDY THE DISTRIBUTION OF HYDROLYTIC ENZYMATIC ACTIVITIES IN SEDIMENTS

Gordeeva E.L.<sup>1</sup>, Izotova S.A.<sup>2</sup><sup>1</sup>D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology*Miusskaya Sq., 9, Moscow, 125047, Russia; e-mail: Elena.Gordeeva311@yandex.ru*<sup>2</sup>Moscow Automobile and Road Engineering State Technical University (MADI)*Leningradsky Ave., 64, Moscow, 125319, Russia*

Received 10.08.2024

**Abstract.** In this article are presented the results of using wavelets to study the distribution of hydrolytic enzymatic activities in bottom sediments. The values of the potential activities of the protease and amylase enzymes measured at different horizons of two bottom sediment cores obtained in the Norwegian (station 1084) and Barents (station 987) seas were used as initial data. During the analysis, Morlet wavelets were chosen as the basis functions. On the basis of the obtained spectrograms for station 1084, the relationship between the variability of the distribution along the column horizons of both protease and amylase activities with the type of sediment was revealed, however, the structure of the spectrograms is different. For both protease and amylase activity, structures associated with self-similarity of distribution and the presence of periodicity in the data were identified. On the spectrogram of the protease activity of sediment from station 987, large-scale minima reflect changes in the type of sediment in the column (granulometric composition, content of sand and gravel material, layering, etc.), which confirms the hypothesis of the relationship between the values of protease activity and the type of sediment. A region of local high-frequency maxima associated with climate change and the onset of warming is highlighted on the wavelet spectrogram for amylase activity. When comparing the two spectrograms, an antiphase in the distribution of activities was revealed, which may be due to a different type of organic substance from the source of enzymes. Thus, the conducted wavelet analysis revealed the features of the distributions and can be an addition to the usual methods of data analysis and statistical processing.

**Key words:** *hydrolytic enzymatic activities, wavelet, spectrogram.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАНЫ КОЖИ МЕТОДАМИ КРУПНОЗЕРНИСТОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Янь А., Боздаганян М.Е.

Совместный университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне

Интернэшнл роад 1, район Лунган, г. Шэньчжэнь, 518100, Китайская Народная Республика;

e-mail: bozdaganyan.m@smbu.edu.cn

Поступила в редакцию 11.08.2024

**Аннотация.** Доставка активных веществ через кожу имеет важное значение в медицине и косметологии. Эксперименты на человеческой коже дорогостоящие, а альтернативы, такие как свиная или мышьяная кожа, не всегда точно отражают свойства человеческой кожи. Молекулярное моделирование мембран позволяет рассчитать параметры, такие как коэффициенты проницаемости ( $\log K_p$ ) и диффузии, а также структурные характеристики мембраны. В данной работе исследуется взаимодействие химических соединений с липидным бислоем кожи методом молекулярной динамики. Для моделирования использовалось силовое поле MARTINI, а расчёты проводились в программном пакете GROMACS. Мембрана, состоящая из церамидов, холестерина и жирных кислот, уравнивалась в течение 0,5 мкс. Расчёт потенциалов средней силы (ПСС) для малых молекул показал хорошую корреляцию с экспериментальными данными ( $R^2=0,81$ ). Метод может быть использован для предсказания проницаемости веществ через кожу и разработки новых трансдермальных препаратов. В будущем планируется расширение базы тестируемых веществ.

**Ключевые слова:** липидный бислой, проницаемость кожи, крупнозернистое моделирование, молекулярная динамика.

### ВВЕДЕНИЕ

Трансдермальная доставка (ТДД) лекарств обеспечивает постоянное и контролируемое высвобождение препаратов, что помогает поддерживать стабильный уровень вещества в крови и снижает риск побочных эффектов. Она обеспечивает повышенную биодоступность лекарственных веществ вследствие исключения потерь, сопряженных с метаболизмом в желудочно-кишечном тракте и в печени, увеличивая биодоступность лекарства. Такой метод удобен для пациентов благодаря своей неинвазивности и простоте применения, что улучшает соблюдение режима лечения [1]. Однако существуют трудности, включая различия в кожной абсорбции у разных людей и ограниченное количество типов препаратов, подходящих для этого метода [2]. Тестирование проницаемости различных веществ на человеческой коже дорого и часто непрактично, а заменители, такие как свиная кожа, не идеально соответствуют человеческой коже [3].

Существует несколько математических моделей, предсказывающих проницаемость молекул через кожу, самая известная - это модель Поттса и Гая [4], в которой учитываются коэффициент распределения октанол-вода и молекулярный объем соединения. Компьютерные методы, включая методы машинного обучения и расчет количественных соотношений структура-свойство, связывают проницаемость с такими свойствами, как молекулярная масса, липофильность, площадь полярной части молекулы, и пр. [5]. Метод молекулярной динамики также позволяет оценивать проницаемость мембран разнообразного состава для малых молекул. Для этого используется метод расчета потенциала средней силы (ПСС), который выявляет энергетические барьеры для малых молекул [6–8].

В статье мы используем метод крупнозернистого моделирования [9] для прогнозирования коэффициентов проницаемости малых молекул, экспериментальные данные для верификации модели взяты из базы данных SPEDB [10]. В целом, исследование направлено на разработку и оптимизацию протоколов расчета проницаемости малых молекул через модельную мембрану кожи человека, понимание механизмов трансдермального транспорта на молекулярном уровне, что в дальнейшем будет использовано для дизайна новых трансдермальных лекарств и формуляций.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельный липидный бислой кожи представлен как система из жирных кислот (ЖК), церамида (ЦЕР) и холестерина (ХОЛ) в соотношении 1:1:1, система помещена в бокс с водой (рис. 1). Все моделирования молекулярной динамики (МД) выполнялись с использованием программы GROMACS 2022.4 [11]. Начальная конфигурация мембраны ориентирована в плоскости XY, построена с использованием CHARMM-GUI [12], содержит 504 липида (по 168 молекул ЦЕР, СЖК и ХОЛ), поровну разделенных между бислоями, и 5875 молекулы воды с противоионами.

В работе использовано силовое поле MARTINI [9] с поляризуемой водой [13]. Уравнивание системы липидного бислоя кожи проведено в соответствии с рекомендуемым протоколом CHARMM-GUI [12]. Он включает в себя минимизацию энергии с помощью алгоритма наискорейшего спуска и серию коротких (0,75–5 нс) молекулярно-динамических расчетов в ансамблях NVT и NPT. Заключительный этап расчетов

**Таблица 1.** Типы зерен, используемых для предсказания проницаемости через модельную мембрану кожи

Полярность зерна	Тип зерна	Возможность формирования водородных связей
гидрофобное	C1, C2, C3, C4, C5	—
нейтральное	Nda	донор, акцептор
	Nd	донор
	Na	акцептор
	N0	—
гидрофильное	P1, P2, P3, P4, P5	—

мембраны, – это равновесная молекулярная динамика с длиной траектории 0,5 мкс в ансамбле NPT (баростат Парринелло-Рамана, термостат Берендсена) при  $T = 310,15$  К и давлении 1 атмосфера. Окончательный размер системы после уравнивания составляет  $9,5 \times 9,5 \times 11,5$  нм.

Малые молекулы составлены из комбинации 14 зерен разной полярности (табл. 1). Параметризация двойных зерен выполнена в программе auto\_martini [14]. Малые молекулы помещены с двух сторон мембраны на расстояние 4,5 нм вдоль оси Z от центра массы мембраны, таким образом, за один запуск молекулярной динамики можно посчитать 2 профиля потенциала средней силы.

Потенциал средней силы для малых молекул рассчитан как в [15] с использованием подхода зонтичной выборки. Для каждой системы, состоящей из двух малых молекул по обе стороны мембраны, рассчитано порядка 40 окон, расположенных на расстоянии 0,2 нм друг от друга перпендикулярно к плоскости бислоя. Исходные конфигурации окон сгенерированы путем протягивания молекул через мембрану со скоростью 0,01 нм/псек вдоль оси z к центру. Соответствующие конфигурации выбраны в качестве исходных для дальнейшего расчета потенциала средней силы в данном окне (100 нс). Профиль ПСС построен с использованием метода анализа взвешенных гистограмм WHAM, включенного в пакет GROMACS.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для модельной мембраны кожи рассчитаны площадь, приходящаяся на липид, коэффициенты диффузии липидов и профиль плотности для всех молекул (рис. 1).

Площадь, приходящаяся на липид, является важным параметром клеточной мембраны, его значение напрямую влияет на проницаемость. Для исследуемой мембраны средняя площадь на липид составляет  $0,36$  нм<sup>2</sup>, коэффициенты диффузии что согласуется с данными из [16]. Из профиля плотности (рис. 1) мы получаем толщину бислоя мембраны равную 4,84 нм, что согласуется с предыдущими экспериментами [17]. Коэффициенты диффузии рассчитаны из среднеквадратичного отклонения липидов и составляют для ЦЕР  $0,08 \pm 0,02$ , ХОЛ  $0,08 \pm 0,01$ , ЖК  $0,09 \pm 0,02$ , что также подтверждается более ранними исследованиями [16]. Таким образом, модель мембраны валидирована и может быть использована в дальнейшем исследовании.

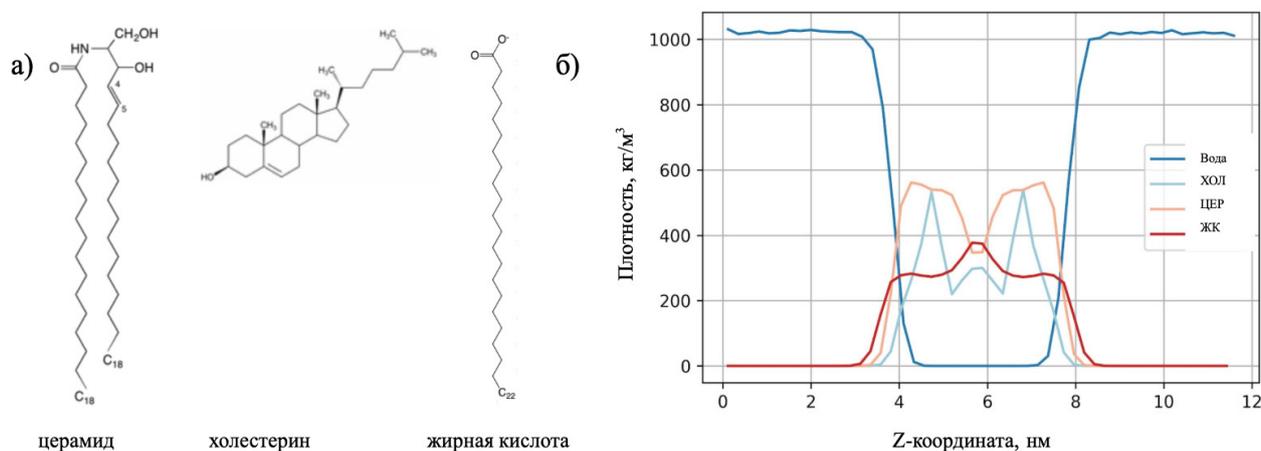
**Рисунок 1.** Характеристики модельной мембраны кожи: а) структурные формулы церамида, холестерина и жирной кислоты, составляющие модельную мембрану и б) профиль плотности

Таблица 2. Примеры малых молекул с предсказанными и экспериментальными  $\log Kp$

Молекула	Тип зерна	$\log Kp$ экспериментальный	$\log Kp$ предсказанный
Бромдихлорметан	C4	-0,74	0,44
Пропанол	Nda	-2,91	-2,31
Триметиламин	P1	-2,31	-2,63
Мочевина	P4	-3,83	-5,24
Гептанол	C1-Nda	-1,5	0,64
Аспарат	P1-P4	-5,03	-7,27

Коэффициент проницаемости ( $Kp$ ), - это числовое значение, описывающее скорость диффузии вещества через кожу. Поскольку значения  $Kp$  могут значительно варьироваться, часто используют десятичный логарифм коэффициента проницаемости ( $\log Kp$ ), чтобы облегчить анализ и сравнение данных. Значение  $\log Kp$  связано с такими свойствами вещества, как липофильность (растворимость в жирах), молекулярная масса и другие параметры, которые могут влиять на его способность проникать через кожный барьер.

Для математического описания процесса диффузии используется уравнение Смолуховского, которое описывает диффузионное поведение частицы в потенциале средней силы:

$$P^{-1} = \int dz \frac{\exp[\beta G(z)]}{D(z)}, \tag{1}$$

где:  $\beta = \frac{1}{k_B T}$ ,

$k_B$  – постоянная Больцмана,

$T$  – абсолютная температура в градусах Кельвина,

$G(z)$  – функция ПСС,

$D(z)$  – локальная диффузия.

Таким образом, для исследуемых веществ можно вычислить значения  $\log Kp$  и сравнить их с экспериментальными данными (табл. 2, рис. 2) [10].

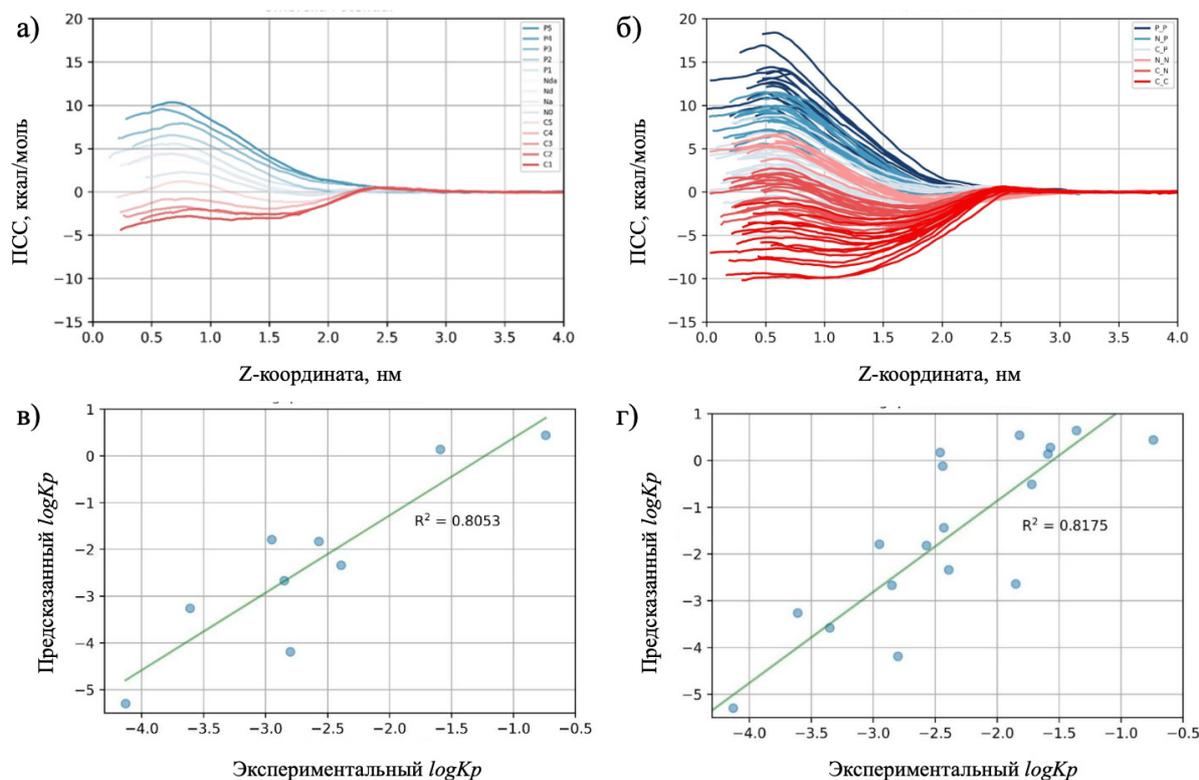


Рисунок 2. Профиль потенциала средней силы для а) мономеров и б) димеров крупнозернистых молекул, сравнение рассчитанных коэффициентов проницаемости с экспериментальными данными для в) мономеров и г) димеров

Как видно из рисунка 2а, б, профили потенциала средней силы отражают общую тенденцию гидрофобных веществ накапливаться в центре мембраны (С-С), а гидрофильных не проникать в нее вовсе (Р-Р). Для каждой молекулы рассчитан  $\log Kp$  по формуле (1), указанной выше. Далее полученные значения проницаемости сравниваются с экспериментальными данными, собранными нами ранее в отдельную базу данных [10]. Молекулы из базы данных при помощи программы *auto\_martini* [14] предварительно параметризованы в силовом поле MARTINI. Таким образом, молекула мочевины представляет собой одно единственное зерно Р4, а молекула бромдихлорметана - С4, аспарат, - это два зерна Р1-Р4 и т.д. (табл. 2). Предсказанная  $\log Kp$  и показывает хорошую корреляцию ( $R^2 > 0,8$ ) с экспериментальными данными (рис. 2в, г).

Таким образом, наше исследование демонстрирует, что метод крупнозернистого моделирования может эффективно предсказывать проницаемость малых молекул через модельную мембрану кожи. В будущем мы планируем улучшить модель, интегрировав её с существующими компьютерными методами, включая машинное обучение и расчёт количественных соотношений структура-свойство. Кроме того, планируется расширение химического пространства тестируемых веществ, что позволит использовать модель для разработки новых лекарственных средств для трансдермальной доставки.

#### Список литературы / References:

1. Ramadon D., McCrudden M.T.C., Courtenay A.J., Donnelly R.F. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Deliv Transl Res.*, 2022, vol. 12, pp. 758-791, doi: 10.1007/s13346-021-00909-6.
2. Neupane R., Boddu S.H.S., Renukuntla J., Babu R.J., Tiwari A.K. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics*, 2020, vol. 12, doi: 10.3390/pharmaceutics12020152.
3. Sutterby E., Thurgood P., Baratchi S., Khoshmanesh K., Pirogova E. Microfluidic Skin-on-a-Chip Models: Toward Biomimetic Artificial Skin. *Small*, 2020, vol. 16, e2002515, doi: 10.1002/smll.202002515.
4. Potts R.O., Guy R.H. Predicting skin permeability. *Pharm Res.*, 1992, vol. 9, pp. 663-669, doi: 10.1023/a:1015810312465.
5. Pecoraro B., Tutone M., Hoffman E., Hutter V., Almerico A.M., Traynor M. Predicting Skin Permeability by Means of Computational Approaches: Reliability and Caveats in Pharmaceutical Studies. *J Chem Inf Model*, 2019, vol. 59, pp. 1759-1771, doi: 10.1021/acs.jcim.8b00934.
6. Bozdaganyan M.E., Orekhov P.S. Synergistic Effect of Chemical Penetration Enhancers on Lidocaine Permeability Revealed by Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations. *Membranes*, 2021, vol. 11, doi: 10.3390/membranes11060410.
7. Bozdaganyan M.E., Orekhov P.S., Shaytan A.K., Shaitan K.V. Comparative computational study of interaction of C60-fullerene and tris-malonyl-C60-fullerene isomers with lipid bilayer: relation to their antioxidant effect. *PLoS One*, 2014, vol. 9, e102487, doi: 10.1371/journal.pone.0102487.
8. Kholina E.G., Kovalenko I.B., Bozdaganyan M.E., Strakhovskaya M.G., Orekhov P.S. Cationic Antiseptics Facilitate Pore Formation in Model Bacterial Membranes. *J Phys Chem B*, 2020, vol. 124, pp. 8593-8600, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c07212.
9. Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S., Tieleman D.P., de Vries A.H. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B*, 2007, vol. 111, pp. 7812-7824, doi: 10.1021/jp071097f.
10. Vasyuchenko E.P., Orekhov P.S., Armeev G.A., Bozdaganyan M.E. CPE-DB: An Open Database of Chemical Penetration Enhancers. *Pharmaceutics*, 2021, vol. 13, doi: 10.3390/pharmaceutics13010066.
11. Pall S., Zhmurov A., Bauer P., Abraham M., Lundborg M., Gray A. et al. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. *J Chem Phys.*, 2020, vol. 153, p. 134110, doi: 10.1063/5.0018516.
12. Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.*, 2008, vol. 29, pp. 1859-1865, doi: 10.1002/jcc.20945.
13. Yesylevskyy S.O., Schafer L.V., Sengupta D., Marrink S.J. Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field. *PLoS Comput Biol.*, 2010, vol. 6, e1000810, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000810.
14. Bereau T., Kremer K. Automated parametrization of the coarse-grained Martini force field for small organic molecules. *J Chem Theory Comput.*, 2015, vol. 11, pp. 2783-2791, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00056.
15. Hoffmann C., Centi A., Menichetti R., Bereau T. Molecular dynamics trajectories for 630 coarse-grained drug-membrane permeations. *Sci Data*, 2020, vol. 7, p. 51, doi: 10.1038/s41597-020-0391-0.
16. Kumar S., Yadav D.K., Choi E.-H., Kim M.-H. Insight from Molecular dynamic simulation of reactive oxygen species in oxidized skin membrane. *Sci Rep.*, 2018, vol. 8, p. 13271, doi: 10.1038/s41598-018-31609-w.
17. Kucerka N., Nieh M.-P., Pencer J., Sachs J.N., Katsaras J. What determines the thickness of a biological membrane. *Gen Physiol Biophys.*, 2009, vol. 28, pp. 117-125, doi: 10.4149/gpb\_2009\_02\_117.

## COARSE-GRAINED MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS OF THE SKIN MEMBRANE PERMEABILITY

Yang A., Bozdaganyan M.E.

Shenzhen MSU-BIT University

*International road 1, Longgang district, Shenzhen, 518100, China; e-mail: bozdaganyan.m@smbu.edu.cn*

Received 11.08.2024

**Abstract.** Delivery of active substances through the skin is of great importance in medicine and cosmetology. Experiments on human skin are expensive, and alternatives such as pig or mouse skin do not always accurately reflect the properties of human skin. Molecular modeling of membranes allows one to calculate parameters such as permeability ( $\log K_p$ ) and diffusion coefficients, as well as structural characteristics of the membrane. In this work, we study the interaction of chemical compounds with the lipid bilayer of the skin using the molecular dynamics method. The MARTINI force field was used for modeling, and the calculations were performed in GROMACS. The membrane, consisting of ceramides, cholesterol and fatty acids, was equilibrated for 0,5 microsecond. Calculation of the potentials of mean force (PMF) for small molecules showed good correlation with the experimental data ( $R^2=0.81$ ). The method can be used to predict the permeability of substances through the skin and to develop new transdermal drugs. In the future, it is planned to expand the database of tested substances.

**Key words:** *lipid bilayer, skin permeability, coarse-grained modeling, molecular dynamics.*

## STUDY OF ELECTRONIC PROPERTIES BY DFT OF SE6 AND 5-FLUOROURACIL DRUG DELIVERY SYSTEM

Solano Gonzalez L.I., Morales Marco A., Agustin Serrano R., Zenteno Mateo B., Cervantes Tavera A.M., Hernandez Santiago A.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

Ciudad Universitaria CU, San Claudio S/N. C.P 72570, Puebla, Pue., Mexico

Received: 09.08.2024

**Abstract.** The electron density of the HOMO is observed to concentrate on Se6, thus attracting electron density and rendering 5-flu inert, which is crucial for its transport, avoiding premature reactions until its release. LUMO analysis indicates that 5-flu has full energy levels, while Se6 behaves as an electron acceptor. The high negative formation energy suggests a highly stable substance. Furthermore, physical adsorption facilitates controlled drug release. Overall, the system proves to be stable and reactive, with Se6 efficiently protecting and releasing 5-flu. This study suggests that: the combination of SeNPs and 5-flu is a promising strategy for the molecular design of new cancer therapies implementing methodologies based on quantum chemistry and electron density theory (DFT), which allows a deep analysis of drug-drug interactions, optimizing the design of drug delivery systems at the molecular level. The results substantiate the physical stability and chemical reactivity of the system. The electron-withdrawing behavior of Se6 and its ability to recombine after 5-flu release underscore its potential in pharmaceutical and drug delivery applications.

**Key words:** Cancer, Computational simulation, DFT, pharmacology.

## INTRODUCTION

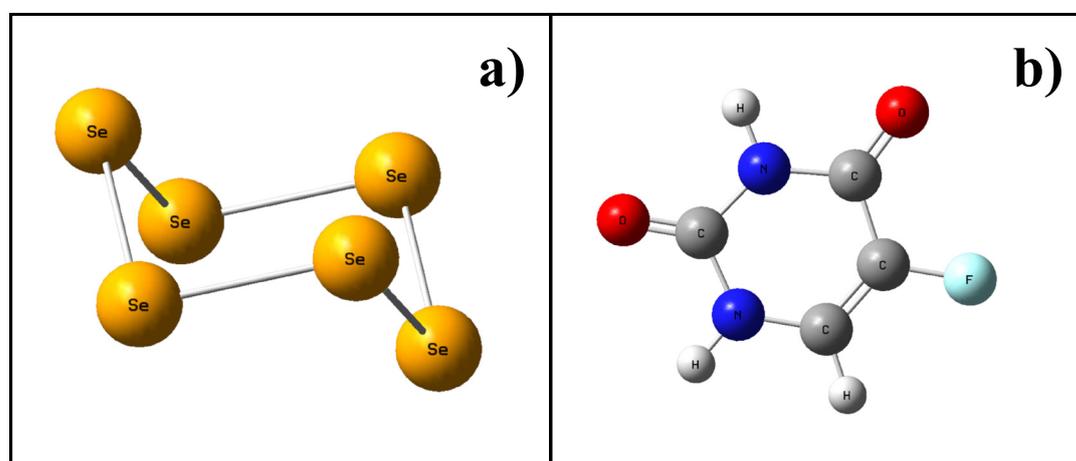
In recent times, there have been significant advances in delivery systems, improving the delivery of therapeutic agents or active natural compounds to their specific targets for the treatment of a wide range of diseases [1].

Selenium (Se), with semiconducting, anticancer and antioxidant properties, is especially promising in the form of nanoparticles (SeNPs). SeNPs have significantly lower toxicity than selenium salts, with a lethal dose of 113 mg Se/kg [2]. In addition, SeNPs are biocompatible, bifunctional and biodegradable, desirable features in drug delivery systems [3]. 5-fluorouracil (5-flu) is a drug used to treat several types of cancer, including colon, breast, and head cancers. However, its efficacy is limited by its toxicity and the body's ability to adapt to it, reducing its long-term effectiveness. 5-flu works by interfering with nucleoside metabolic processes due to its similarity to the nitrogenous bases of DNA and RNA, resulting in cytotoxicity [4]. In 2012, Wen Liu and his team demonstrated that a drug delivery system combining SeNPs with 5-flu improves drug absorption and significantly reduces drug toxicity [5]. Even more, there are not scientific works (as far as we report in our references) over the electronic properties of the organometallic 5flu-6Se.

This study suggests that: the combination of SeNPs and 5-flu is a promising strategy for the design of novel anticancer therapeutics in conjunction of quantum chemistry and electron density theory (DFT), enables in-depth analysis of drug-drug interactions, optimizing the design of drug delivery systems at the molecular level.

## COMPUTATIONAL MODEL

For the construction of the models, the basal state of Se6 and 5-fluorouracil (5-flu) were considered, as shown in model 1.1. Interatomic distances of 2.0 Å were taken into account for the interactions between the oxygen radicals of the 5-flu molecule and the Se6 rings as can be seen in Figure 1.



**Figure 1.** Molecules of a) Se6 and b) 5-fluorouracil molecular geometries optimized by DFT with B3LYP/6-31G hybrid functional in vacuum medium

The simulations were carried out using the software GaussView 6.0.16 and Gaussian 9. For the Density Functional Theory (DFT) calculations, the hybrid functional B3LYP was used with the 6-31G calculation base, which demonstrates the validity of the parameters used in terms of bond angles and lengths [6]. Molecular geometry optimization calculations were carried out on the model. Frequencies were calculated at 298.15 K to validate that the optimized geometries represented true minima on the potential energy surface, confirming the absence of imaginary frequencies in all configurations.

Energy calculations were carried out to obtain the energy levels and electron density distribution of the HOMO (highest energy occupied orbital) and LUMO (lowest energy unoccupied orbital) molecular orbitals. In addition, electrostatic potential (MEP) maps were generated for all configurations, performing all calculations in a vacuum.

Based on Koopmans' theorem, molecular quantum descriptors were calculated based on the values of the energies of the HOMO and LUMO orbitals, providing valuable information about the behavior and properties at the quantum level of the molecules in the system. These descriptors included the chemical potential ( $\mu$ ), the global hardness ( $\eta$ ) and the electrophilicity index ( $\omega$ ), determining the reactivity and stability of the systems, as well as the number of electrons transferred between two systems ( $\Delta N$ ). Furthermore, the adsorption criteria were evaluated to determine whether the interaction corresponded to physisorption or chemisorption and the cohesion energy to evaluate the molecular geometry and interaction strength [7].

$$I = E_{HOMO} \quad (1)$$

$$I = E_{LUMO} \quad (2)$$

$$\eta = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (3)$$

$$\Delta N = \frac{(\mu_B - \mu_A)}{2(\eta_A + \eta_B)} \quad (4)$$

$$E_{ads} = E_{complex} - (E_{Se6} + E_{5flu}) \quad (5)$$

$$E_{form} = E_{complex} - (nE_C + nE_{Se} + \dots nxE_x) \quad (6)$$

$$E_{coh} = \frac{E_{complex} - (nCE_C + nSeE_{Se} + \dots nxE_x)}{\sum n_{atoms}} \quad (7)$$

## RESULTS OF THE MOLECULAR DESCRIPTORS

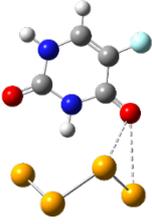
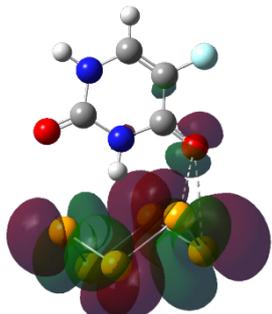
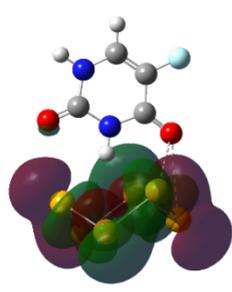
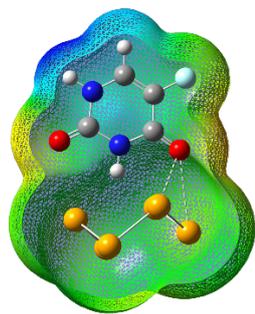
Regarding the distribution of the electronic density of the HOMO in model a) Se6 is the one that attracts all the electronic density, elements such as metals, metalloids such as Se and oxygen atoms have the ability to attract electronic density, therefore the rest of the 5-flu molecule remains inert, which is important for transport because 5-flu does not have the ability to react with other chemical species until it is released. As for LUMO, it shows that 5-flu has all its energy levels full, it does not have the capacity for reaction power, while the system acquires a character as an electron acceptor because Se6 has its energy levels unoccupied, which is important. to be valued because once it delivers the 5-flu it can recombine and re-synthesize.

The molecular band gap is useful to detail the reactivity and chemical stability of the system by measuring the activation hardness. The 5-flu molecule is greater than 4.5 eV, a characteristic value for organic and insulating molecules. In the case of Se6, the molecular GAP value tends to 9.24 eV, which value would denote an insulating behavior, however, as it lacks the presence of hydrogens or In a non-electrolytic medium such as water, there is a decompensation in the electrical charge. The value of the molecular GAP of the Se6 ring with the presence of hydrogen helps with the compensation of electrical charges. Therefore, the value of the molecular GAP is around 2.08 eV if we compare it with the bandgap energy of the SeNPs, reporting a value of 1.65, 1.85 and 2.05 eV for monoclinic and amorphous particles respectively. In model a) the energy indicates good stability and high energy to be able to alter the system and participate in other chemical reactions.

**Table 1.** Energy (eV) of the HOMO and LUMO orbitals, and global molecular descriptors of each model in vacuum

Descriptors	Se6	5-Fluoroacil	Model a
E TOTAL	-389965.433	-13987.414	-405694.155
E HOMO	-9.4393	-7.3182	-6.6779
E LUMO	-0.1975	-1.9288	-3.1831
GAP M.	9.2418	5.3894	3.4948
I= -E <sub>HOMO</sub>	9.4393	7.3182	6.6779
A=-E <sub>LUMO</sub>	0.1975	1.9288	3.1831
$\eta = (I-A)/2$	4.6209	2.6947	1.7474
$\mu = -(I+A)/2$	-4.8184	-4.6235	-4.9305
$\omega = (\mu^2)/(2*\eta)$	2.5122	3.9664	6.9560
S=1/ $\mu$	0.2075	0.2162	-0.2028

**Table 2.** Model a) Se6/5-fluorouracil system, optimized molecular geometries and HOMO/LUMO electronic distribution and electrostatic potential map in a vacuum calculated using DFT with B3LYP/6-31G hybrid functional in a vacuum

Models	HOMO	LUMO	Electrostatic potential map (MEP)
<b>Model a)</b> 			

The overall hardness indicates the resistance of the molecule or system to change its electron density. Higher values indicate a less reactive molecule; therefore, we observe that both Se6 and 5-flu molecules are much less reactive separately, but when they are in a system like model 1, the energy tends to decrease considerably, which indicates that the system is highly reactive [8].

The chemical potential is directly associated with the Gibbs free energy with respect to the number of electrons, which represents the ability of a molecule to accept or donate electrons. The negative values indicate that the molecules tend to accept electrons. Both the Se6 and 5-flu molecules as well as model a have very similar energies to each other, however model a has a higher value, which means that when adding an electron to the system will tend to decrease the total energy of the system, that is, the Gibbs free energy of the system decreases and therefore the system has a tendency to gain electrons rather than donate them. Furthermore, at be an analogue to The Gibbs free energy, having a negative value, describes an exothermic process [9].

The electrophilicity index indicates the tendency of a molecule to accept electrons, as we observe, higher values indicate greater electrophilicity, therefore model a has a tendency to be an electron acceptor. Electronic softness indicates the reactivity of the system, as higher values indicate greater reactivity and as we see, the Se6 and 5-flu molecules present greater chemical reactivity when separated, but when they are together in the system, the decrease in chemical reactivity is evident [10].

**Table 3.** Formation, cohesive, adsorption and charge transfer energies ( $\Delta N$ ) in eV

Model a)	Valué
<b>Formation energy</b>	-97.2699
<b>Cohesive energy</b>	-5.4038
<b>Adsorption energy</b>	-1740.9503
$\Delta N$	-0.01332

The formation energy indicates that the formation of the substance is highly exothermic, meaning that the substance releases a large amount of energy during its formation. Having a negative value far from zero suggests that the substance formed is much more stable than its constituent elements in their standard state. See Table 3. The negative value reported indicates that the system is much more stable than its isolated constituents.

The adsorption energy criterion indicates that a value greater than -0.5 indicates a chemisorption process, the reverse is a physisorption process. Model a) has a value of (-1740.9503) which indicates a physical adsorption process. Physical adsorption is important to the system because high levels of energy are not required to separate the drug from its transport. The value of  $\Delta N$  suggests that the flow of electrons comes from the 5-flu towards the Se6 ring, which is why the 5-flu remains inert and Se6 is the species that has even the highest electron density [11].

## CONCLUSIONS

These results highlight the stability and reactivity of the system, suggesting that the Se6 ring acts as a good carrier for the drug 5-flu, protecting it from external reactions to its transport and release. The high negative formation energy and physical adsorption characteristic suggest that the system is stable and efficient for controlled drug release. Furthermore, the electron-withdrawing behavior of Se6 and its ability to recombine after 5-flu release underlines its potential in pharmaceutical and drug delivery applications.

**References:**

1. Patra J.K., Gitishree D., Fraceto L.F., Campos E.V.R., Rodriguez-Torres M.delP., Acosta-Torres L.S., Diaz-Torres L.A. et. al. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 2018, vol. 16, no. 1, doi: 10.1186/s12951-018-0392-8.
2. Rayman M.P. The Importance of Selenium to Human Health. *Lancet*, 2000, vol. 356, no. 9225, pp. 233-241, doi: 10.1016/s0140-6736(00)02490-9.
3. Zhang Ning, Ying Yin, Sheng-Jie Xu, Wei-Shan Chen. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2008, vol. 13, no. 8, pp. 1551-1569, doi: 10.3390/molecules13081551.
4. Grem J.L. 5-Fluorouracil: Forty-plus and Still Ticking. A Review of Its Preclinical and Clinical Development. *Investigational New Drugs*, 2000, vol. 18, no. 4, pp. 299-313, doi: 10.1023/a:1006416410198.
5. Liu Wen, Xiaoling Li, Yum-Shing Wong, Wenjie Zheng, Yibo Zhang, Wenqiang Cao, Tianfeng Chen. Selenium Nanoparticles as a Carrier of 5-Fluorouracil to Achieve Anticancer Synergism. *ACS Nano*, 2012, vol. 6, no. 8, pp. 6578-6591, doi: 10.1021/nn202452c.
6. Chandrakumar K.R.S., Sourav Pal. The Concept of Density Functional Theory Based Descriptors and Its Relation with the Reactivity of Molecular Systems: A Semi-Quantitative Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 2002, vol. 3, no. 4, pp. 324-337, doi: 10.3390/i3040324.
7. Martinez-Cano A., Mendoza-Baez R., Zenteno-Mateo B., Rodriguez-Mora J.I., Agustin-Serrano R., Morales M.A. Study by DFT of the functionalization of amylose/amylopectin with glycerin monoacetate: Characterization by FTIR, electronic and adsorption properties. *Journal of Molecular Structure*, 2022, vol. 1269, p. 133761, doi: 10.1016/j.molstruc.2022.133761.
8. Sanjay A., Palepu N.R., Sutradhar D., Shepherd S.L., Phillips R.M., Kaminsky W., Chandra A.K., Kollipara M.R. Neutral and Cationic Half-Sandwich Arene Ruthenium, Cp\*Rh and Cp\*Ir Oximate and Oxime Complexes: Synthesis, Structural, DFT and Biological Studies. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2016, vol. 820, pp. 70-81, doi: 10.1016/j.jorganchem.2016.08.004.
9. Imad A., Kuznetsov A.E., Pirzada A.S., Alsharif K.F., Daglia M., Khan H. Computational pharmacology and computational chemistry of 4-hydroxyisoleucine: Physicochemical, pharmacokinetic, and DFT-based approaches. *Frontiers in chemistry*, 2023, no. 11, doi: 10.3389/fchem.2023.1145974.
10. Davood F., Ghazanfary S. DFT Studies of Functionalized Zigzag and Armchair Boron Nitride Nanotubes as Nanovectors for Drug Delivery of Collagen Amino Acids. *Structural Chemistry*, 2014, vol. 25, no. 1, pp. 293-300, doi: 10.1007/s11224-013-0292-3.
11. Linlin M., Liu T., Li J., Yang Q. Interaction Characteristics and Mechanism of Cr(VI)/Cr(III) with Microplastics: Influence Factor Experiment and DFT Calculation. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, no. 134957-134957, doi: 10.1016/j.jhazmat.2024.134957.

**ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ДПФ ЭЛЕКТРОННЫХ СВОЙСТВ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ Se6 И 5-ФТОРУРАЦИЛА**

**Солано Гонсалес Л.И., Моралес Марко А., Агустин Серрано Р., Зентено Матео Б., Сервантес Тавера А.М., Эрнандес Сантьяго А.А.**

Автономный университет Пуэбла

г. Пуэбла, Мексика

Поступила в редакцию: 09.08.2024

**Аннотация.** Наблюдается, что электронная плотность ВЗМО концентрируется на Se6, тем самым притягивая электронную плотность и делая 5-флу инертным, что имеет решающее значение для его транспорта, избегая преждевременных реакций до его высвобождения. LUMO-анализ показывает, что 5-flu имеет полные энергетические уровни, а Se6 ведет себя как акцептор электронов. Высокая отрицательная энергия образования предполагает высокую стабильность вещества. Кроме того, физическая адсорбция облегчает контролируемое высвобождение лекарства. В целом система оказывается стабильной и реактивной: Se6 эффективно защищает и высвобождает 5-грипп. Это исследование предполагает, что: комбинация SeNP и 5-flu является многообещающей стратегией для молекулярного дизайна новых методов лечения рака, реализующих методологии, основанные на квантовой химии и теории электронной плотности (DFT), что позволяет глубоко анализировать лекарственные взаимодействия, оптимизация конструкции систем доставки лекарств на молекулярном уровне. Результаты подтверждают физическую стабильность и химическую реакционную способность системы. Электроноакцепторное поведение Se6 и его способность рекомбинировать после высвобождения 5-гриппа подчеркивают его потенциал в фармацевтических приложениях и приложениях для доставки лекарств.

**Ключевые слова:** Рак, Компьютерное моделирование, ДПФ, фармакология.

## АГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1, СОЕДИНЕНИЕ SKF-10047, ПОДАВЛЯЕТ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ 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

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

Поступила в редакцию 09.08.2024

**Аннотация.** Статья посвящена исследованию редокс-регуляции транспорта ионов в осморегулирующих эпителиях. Рассматривается влияние фармакологического аналога окисленного глутатиона (GSSG) – дисульфидсодержащего иммуномодулятора глутоксима® на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. Глутоксим относится к группе тиопозтинов – препаратов, обладающих системным цитопротекторным эффектом, широко используемых в клинической практике в качестве иммуномодуляторов и цитопротекторов в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний. Глутоксим оказывает комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы его действия далеки от полного понимания. Рецепторы сигма-1 – уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, широко экспрессированные в центральной нервной системе и в периферических тканях, взаимодействующие с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвующие в модуляции многих клеточных процессов. С использованием метода фиксации потенциала исследовано участие рецепторов сигма-1 в регуляции глутоксимом транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки *Rana temporaria*. Впервые показано, что преинкубация кожи лягушки с высокоселективным агонистом сигма-1 рецепторов соединением SKF-10047 (бензоморфана-(+)-N-аллилнорметазоцина гидрохлорид) полностью подавляет стимулирующее влияние глутоксима на трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ . Полученные результаты свидетельствуют об участии сигма-1 рецепторов в регуляторном действии глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. Данные о модулирующем влиянии соединения SKF-10047 на регуляцию глутоксимом трансэпителиального транспорта  $\text{Na}^+$  способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных GSSG и бензоморфана, а также дополняют данные о функциональной роли тиопозтинов и сигма-1 рецепторов в физиологии осморегулирующих эпителиев, и могут быть полезны для применения данных препаратов в клинической практике.

**Ключевые слова:** транспорт  $\text{Na}^+$ , глутоксим, рецепторы сигма-1, соединение SKF-10047, эпителий кожи лягушки.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Для практической медицины большой интерес имеет изучение транспорта ионов в почке, являющейся уникальным органом по разнообразию, интенсивности и избирательности транспортных процессов, а также по многообразию механизмов их селективного регулирования. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевой пузырь амфибий. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов трансэпителиального транспорта воды и ионов в клетках почки [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. В то же время, влияние окислителей и восстановителей на транспорт  $\text{Na}^+$  в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки, практически не изучено.

Важнейшую роль в редокс-регулируемых внутриклеточных сигнальных путях играют эндогенные системы глутатиона. Глутатион ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин) существует в клетке в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах и является универсальным тиолсодержащим трипептидом, обнаруженным в большинстве клеток растений, микроорганизмов и млекопитающих. Глутатион предотвращает окисление SH-групп или восстанавливает S-S связи, индуцированные окислительным стрессом, инактивирует свободные радикалы, участвует в детоксикации токсических ксенобиотиков (лекарственных веществ, канцерогенов) [2], участвует в активации транскрипции генов, в том числе некоторых антиоксидантных ферментов, а также

ингибировании редокс-зависимых путей активации апоптоза; входит в систему детоксикации и антиоксидантной защиты, предупреждения и ограничения окислительного стресса [3,4].

На основе дисульфидсодержащих окисляющих агентов был синтезирован и успешно применён в клинической практике целый ряд фармакологических препаратов, которые были объединены в группу тиопозтинов, характеризующихся системным цитопротекторным эффектом [5,6]. Фармакологический аналог GSSG – препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) широко используется как иммуномодулятор и цитопротектор в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний. Этот препарат оказывает комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы его действия далеки от полного понимания.

Ранее нами было показано, что транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки модулируется различными окисляющими агентами, такими как GSSG и его фармакологические аналоги [7]. 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 [8], протеинкиназа C [9], серин/треониновые протеинфосфатазы PP1/PP2 [10], а также микротрубочки и актиновые филаменты [10,11].

Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикула на границе с митохондриями [12]. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [12,13]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [14]. В настоящее время лиганды сигма-1 рецепторов рассматриваются в качестве потенциальных терапевтических агентов для лечения самых различных заболеваний, в том числе острого повреждения почек, хронической болезни почек, диабетической нефропатии, а также в качестве поддерживающей терапии при трансплантации почек и зависимой от пола ренопротекции [15].

В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие сигма-1 рецепторов в регуляции глутоксимом транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали высокоселективный агонист сигма-1 рецепторов – синтетический опиоидный анальгетик семейства бензоморфана – (+)-N-аллилнорметазоцина гидрохлорид – SKF-10047 [13].

## 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 °C).

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  $\text{Na}^+$  оценивали как амилорид-чувствительный  $I_{SC}$ .

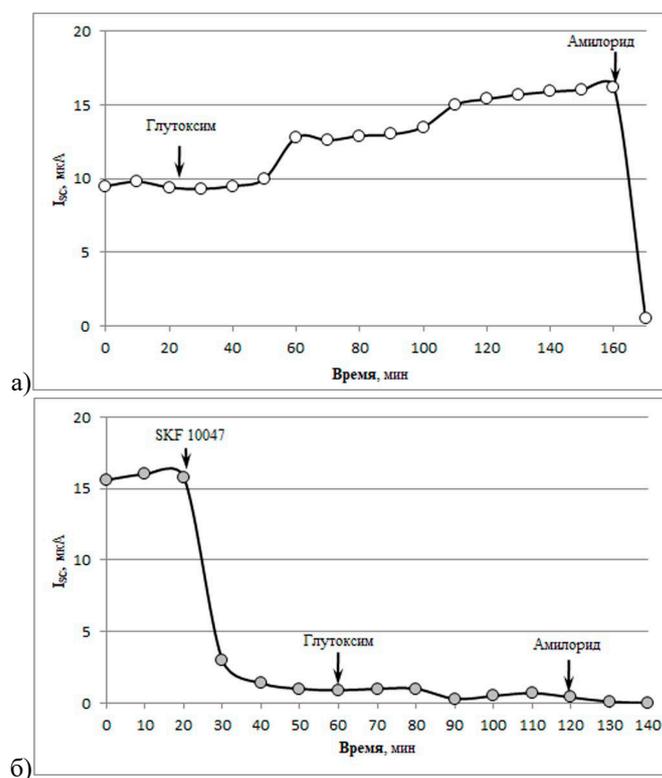
Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточный раствор амилорида (10 мМ) готовили на воде. Маточный раствор SKF-10047 (10 мМ) готовили на DMSO. Глутоксим предоставлен фирмой «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург. Маточный раствор глутоксима (50 мг/мл) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к апикальной или 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:  $I_{SC} = 10,85 \pm 4,31$  мкА;  $V_{OC} = -22,35 \pm 6,03$  мВ;  $g_T = 0,37 \pm 0,02$  мСм.

Показано, что глутоксим (100 мкг/мл), приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулирует транспорт  $\text{Na}^+$ ; данные приведены в таблице 1 и на рисунке 1, а. 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



**Рисунок 1.** Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{sc}$  через кожу лягушки при приложении глутоксима (100 мкг/мл) к базолатеральной поверхности нативной кожи (а) и кожи лягушки, предварительно обработанной селективным агонистом сигма-1 рецепторов – соединением SKF-10047 (50 мкМ) (б); в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных  $Na^+$ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [16,17]. 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 обработка базолатеральной поверхности кожи соединением SKF-10047 (50 мкМ) в течение 30 мин перед добавлением к той же поверхности кожи глутоксима (100 мкг/мл), полностью предотвращает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $Na^+$ , что свидетельствует об участии сигма-1 рецепторов в регуляторном действии глутоксима на транспорт  $Na^+$  в коже лягушки (таблица 1, рис. 16). Показано также, что SKF-10047 модулирует трансэпителиальный транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. В среднем, изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 50 мкМ SKF-10047 со стороны базолатеральной поверхности кожи было следующим:  $I_{sc}$  уменьшился на  $90,22 \pm 13,65 \%$ ,  $V_{oc}$  уменьшился на  $87,42 \pm 18,38 \%$ , а  $g_T$  уменьшилась на  $5,62 \pm 1,37 \%$ .

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Известно, что в клетке сигма-1 рецепторы локализованы, преимущественно, в особой морфофункциональной единице, которая представляет собой область контакта наружной мембраны митохондрий и эндоплазматического ретикулума – в мембранах, ассоциированных с митохондриями (МММ). Эпителиальные клетки имеют апикально-базальную полярность, которая является результатом дифференциального распределения фосфолипидов, белковых комплексов и компонентов цитоскелета между различными доменами плазматической мембраны, что отражает их специализированные функции. К сожалению, в настоящее время данные о субклеточной локализации сигма-1 рецепторов в эпителиальных клетках различных типов крайне немногочисленны. Однако, исследование распределения сигма-1 рецепторов в моделях *in vitro* на культуре эпителиальных клеток проксимальных канальцев человека (линия НК2) показало, что в нормальных условиях сигма-1 рецепторы локализованы, преимущественно, в перинуклеарной области, тогда как после взаимодействия с лигандом они обнаруживаются повсеместно в цитозоле и ядре [18]. В типичной полярной эпителиальной клетке ядро, эндоплазматический ретикулум и митохондрии всегда смещены к базолатеральному полюсу. Полученные нами результаты также свидетельствуют о том, что основные мишени для действия SKF-10047 локализованы в базолатеральном домене клеток эпителия кожи лягушки.

Известно, что рецепторы сигма-1 взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [14]. Так, в последнее время появляются данные о том, что рецепторы сигма-1 модулируют активность ионных каналов различных типов, в том числе протон-активируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства

Таблица 1. Влияние глутоксима на электрические характеристики кожи лягушки

Электрические характеристики кожи лягушки	Изменение электрических характеристик после приложения 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %	Изменение электрических характеристик после приложения 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки, предварительно обработанной 50 мкМ SKF-10047, %
I <sub>sc</sub>	↑ 39,18 ± 11,23	↓ 50,33 ± 6,08
V <sub>oc</sub>	↑ 41,84 ± 13,32	↓ 54,12 ± 8,34
g <sub>T</sub>	↑ 2,18 ± 0,09	↓ 3,05 ± 0,04

Deg/ENaC, к которому принадлежат и амилорид-чувствительные эпителиальные Na<sup>+</sup>-каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте Na<sup>+</sup> в реабсорбирующих эпителиях. Обнаружено, что возможно как прямое взаимодействие между рецепторами сигма-1 и ASICs, с образованием комплекса со стехиометрией 1 рецептор сигма-1/1 субъединица ASIC [19], так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов сигма-1 рецепторов на ASICs, при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как гетеротримерные G-белки и комплекс кальцинейрина с адаптерным белком AKAP150 [20].

Известно, что различные Na<sup>+</sup>-транспортирующие белки – ENaC, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазы и Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменники – содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей. Добавление в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ), вызывало полное подавление транспорта Na<sup>+</sup> (рис. 1). Это свидетельствует о том, что влияние глутоксима на транспорт Na<sup>+</sup> обусловлено в основном модуляцией активности ENaC.

Полученные нами результаты о модулирующем влиянии соединения SKF-10047 на регуляцию глутоксимом трансэпителиального транспорта Na<sup>+</sup> способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных GSSG и бензоморфана, а также дополняют данные о функциональной роли тиопоетинов и сигма-1 рецепторов в физиологии осморегулирующих эпителиев, и могут быть полезны для применения данных препаратов в клинической практике. В то же время, сигнальные каскады, вовлеченные в регуляцию глутоксимом транспорта Na<sup>+</sup> в коже лягушки, во многом неясны, и требуют дальнейшего исследования.

Работа выполнена в рамках Договора СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03-20 от 12.03.2020.

#### 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. Hayes J.D., McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 1999, vol. 31, no. 4, pp. 273-300, doi: 10.1080/10715769900300851.
3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. II. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции. *Биомед. Химия*, 2009, т. 55, № 4, с. 365-379 [Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. Glutathione system. II. Other enzymes, thiol-disulfide metabolism, inflammation and immunity, functions. *Biomed. Chemistry*, 2009, vol. 55, no. 4, pp. 365-379 doi: 10.1134/S1990750809030019 (In Russ.)].
4. Uys J.D., Mulholland P.J., Townsend D.M. Glutathione and redox signaling in substance abuse. *Biomed Pharmacother.*, 2014, vol. 68, no. 6, pp. 799-807, doi: 10.1016/j.biopha.2014.06.001.
5. Borisov A.E., Kozhemyakin L.A., Antushevich A.E., Ketliskaya O.S., Kashchenko V.A., Chepur S.V., Katsalucha V.V., Vasyukova E.L., Novichenkov A.O., Motushchuk I.E. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoeitin group medicines for cirrhosis of the liver. First communication, *Vestnic hirurgii im. I.I. Grekova*, 2001, vol. 4, no. 2, pp. 32-38.
6. 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, no. 6, pp. 51-56.
7. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide-containing agents on the Na<sup>+</sup> transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2008, vol. 421, pp. 235-238, doi: 10.1134/s0012496608040042.
8. 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 Na<sup>+</sup> transport in frog skin. *Cell and Tissue Biology*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 273-279, doi: 10.1134/S1990519X10030090.
9. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E. The involvement of protein kinase C in the effect of oxidized glutathione and glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in frog skin. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2009, vol. 3, no. 3, p. 323, doi: 10.1134/S1990747809030349.

10. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in frog skin: the role of cytoskeleton. *Cell and Tissue Biology*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 248-253, doi: 10.1134/S1990519X1203008X.
11. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The involvement of microtubules in the glutoxim regulation of Na<sup>+</sup> transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2012, vol. 445, pp. 227-229.
12. Pergolizzi J., Varrassi G., Coleman M., Breve F., Christo D.K., Christo P.J., Moussa C. The sigma enigma: a narrative review of sigma receptors. *Cureus*, 2023, vol. 15, no. 3, p. 35756, doi: 10.7759/cureus.35756.
13. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendan C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Current Neuropharmacology*, 2008, vol. 6, pp. 344-366, doi: 10.2174/157015908787386113.
14. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σRs]: biology in normal and diseased states. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2016, vol. 36, no. 4, pp. 327-388, doi: 10.3109/10799893.2015.1015737.
15. Munguia-Galaviz F.J., Miranda-Diaz A.G., Cardenas-Sosa M.A., Echavarria R. Sigma-1 receptor signaling: in search of new therapeutic alternatives for cardiovascular and renal diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, no. 3, p. 1997, doi: 10.3390/ijms24031997.
16. 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, PMID: 16893056.
17. 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, doi: 10.1007/s10630-005-0146-2.
18. Hosszu A., Antal Z., Lenart L., Hodrea J., Koszegi S., Balogh D.B., Banki N.F., Wagner L., Denes A., Hamar P., Degrell P., Vannay A., Szabo A.J., Fekete A. σ1-Receptor agonism protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017, vol. 28, no. 1, pp. 52-165, doi: 10.1681/asn.2015070772.
19. Carnally S.M., Johannessen M., Henderson R.M., Jackson M.B., Edwardson J.M. Demonstration of a direct interaction between σ-1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophysical Journal*, 2010, vol. 98, pp. 1182-1191, doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4293.
20. Herrera Y., Katnik C., Rodriguez J.D., Hall A.A., Willing A., Pennypacker K.R., Cuevas J. Sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008, vol. 327, pp. 491-502, doi: 10.1124/jpet.108.143974.

#### SIGMA-1 RECEPTOR AGONIST, COMPOUND SKF-10047, SUPPRESSES STIMULATIVE EFFECT OF 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 09.08.2024

**Abstract.** The article is devoted to the study of redox regulation of ion transport in osmoregulatory epithelia. The effect of the pharmacological analogue of oxidized glutathione (GSSG), the disulfide-containing immunomodulator glutoxim®, on Na<sup>+</sup> transport in the frog skin epithelium is considered. Glutoxim belongs to the group of thiopoyetins - drugs with a systemic cytoprotective effect, widely used in clinical practice as immunomodulators and cytoprotectors in the complex therapy of bacterial, viral and oncological diseases. Glutoxim has a complex effect on the processes of redox regulation in cells, however, the subtle biophysical mechanisms of its action are far from being fully understood. Sigma-1 receptors are unique ligand-regulated molecular chaperones widely expressed in the central nervous system and peripheral tissues, interacting with numerous target proteins, including ion channels and receptors, and are involved in the modulation of many cellular processes. Using the voltage clamp method, the involvement of sigma-1 receptors in glutoxim regulation of Na<sup>+</sup> transport in the frog *Rana temporaria* skin epithelium was investigated. It was shown for the first time that preincubation of frog skin with a highly selective sigma-1 receptor agonist, compound SKF-10047 (benzomorphan (+)-N-Allyl-N-normetazocine hydrochloride), completely suppresses the stimulating effect of glutoxim on transepithelial Na<sup>+</sup> transport. The results obtained indicate the participation of sigma-1 receptors in the regulatory effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in the frog skin epithelium. Data on the modulating effect of the compound SKF-10047 on glutoxim regulation of transepithelial Na<sup>+</sup> transport contribute to a more detailed understanding of the molecular mechanisms of the pharmacological effect of derivatives of GSSG and benzomorphan, and also complement data on the functional role of thiopoyetins and sigma-1 receptors in the physiology of osmoregulatory epithelia, and may be useful for the usage of these drugs in clinical practice.

**Key words:** Na<sup>+</sup> transport, glutoxim, sigma-1 receptors, compound SKF-10047, frog skin epithelium.

## О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Шипко М.Н.<sup>1</sup>, Сибирев А.Л.<sup>1</sup>, Масленникова О.М.<sup>2</sup>, Степович М.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина

ул. Рабфаковская, 34, г. Иваново, 153003, РФ

<sup>2</sup>Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации

ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А, г. Москва, 121359, РФ

<sup>3</sup>Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского

ул. Степана Разина, 26, г. Калуга, 248023, РФ; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

Поступила в редакцию 09.08.2024

**Аннотация.** В работе рассмотрены особенности каналирования киловольтных электронов в водных растворах новокаина и лидокаина. Для изучения ориентационного и позиционного порядков молекулярных ассоциатов в таких растворах использовали метод газоразрядной визуализации. Киловольтные электроны, ускоренные импульсным электрическим полем, проходили через водный раствор новокаина и лидокаина. Вышедшие из капли раствора электроны ионизировали воздух и вызывали его свечение. Свечение регистрировалось чувствительной фото-видео камерой в диапазоне световых частот с расширением чувствительности в фиолетовой и ультрафиолетовой областях с использованием кварцевого стекла. Газоразрядные изображения переводились системой видеопреобразования в цифровой код и визуализировались на экране компьютера в виде совокупности стримеров, связанных со стереографическими проекциями следов движения электронов, то есть с каналами облегчённого движения в водном растворе и с поверхности капли. Анализ параметров картин газоразрядных изображений растворов выполнялся с использованием программы GDV Scientific Laboratory. С помощью метода газоразрядной визуализации показано, что молекулярные комплексы, образуемые этими основными лекарственными средствами с водой и вспомогательными веществами, формируют каналы облегчённого движения электронов. Установлено, что электрическое поле внутри каналов и кулоновское взаимодействие электронов с молекулярными комплексами лидокаина обеспечивают более высокую энергию электронов, вылетающих из жидкости, и, как следствие, более высокую эффективность торможения положительных ионов  $\text{Na}^+$ , в сравнении с электронами, прошедшими при тех же условиях через каплю раствора с новокаином.

**Ключевые слова:** водный раствор, новокаин, лидокаин, ускоренные электроны, каналирование, газоразрядная визуализация.

### ВВЕДЕНИЕ

Интерес к исследованию лекарственных анестезирующих препаратов, в частности, новокаина и лидокаина, вызван широким использованием в медицинской практике не только в качестве местноанестезирующих средств, но и применением препаратов и их производных для лечения сердечных аритмий, снижения возбудимости моторных зон головного мозга и пр. [1-3]. Весьма интересны и возможности применения микродоз новокаина в педиатрии и гериатрии [4]. Однако, до сих пор парадоксальные с точки зрения медицинской практики гомеопатические инъекции новокаина в активные точки организма не получили своего обоснования в рамках классической медицины. Ожидает дальнейшего исследования безопасность и эффективность лидокаина как антиаритмического средства при купировании пароксизмов желудочковых тахикардий и фибрилляции желудочков [4]. Для выяснения особенностей фармакологических эффектов, вызываемых малыми дозами этих препаратов, требуется наличие прямых физико-химических методов оценки влияния особенностей молекулярного строения препаратов и их влияния на проницаемость мембран. Косвенно такую информацию могут дать методы, позволяющие оценивать параметры транспорта катионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{H}^+$ . Важная роль в таком транспорте зарядов отводится водной среде, особенностям позиционного порядка молекулярных ассоциатов, обеспечивающих каналирование катионов, мембранному потенциалу. Описание всех процессов базируется на моделях, учитывающих межмолекулярное и кулоновское взаимодействия в объёме мембран при наличии воды. В таком случае значение потенциальной энергии каналируемых катионов определяется соотношением физико-химических параметров воды (электропроводностью, электрической восприимчивостью) и водных растворов лекарственных препаратов. В частности, растворы лидокаина и новокаина обладают биохимическими параметрами, обеспечивающими блокировку натриевых каналов [5] в нервных клетках, что препятствует генерации и передаче электрических импульсов в нервных окончаниях. Однако полноценная верификация механизма понижения возбудимости миокарда и моторных зон коры головного мозга в результате комплекса биохимических и биофизических процессов, обусловленных особенностями транспорта зарядов по каналам ионных обменников, возможен только при наличии данных о функциональном состоянии таких каналов.

Достаточно перспективным методом для изучения ассоциативных процессов, лимитируемых изменениями молекулярных комплексов, формирующих такие каналы в структурированных водных растворах лекарственных

средств, является метод газоразрядной визуализации (ГРВ) [6-8]. В этом методе киловольтные электроны (с энергией порядка единиц килоэлектронвольт) проходят через каплю изучаемого раствора (объёмом порядка единиц кубического миллиметра), после чего выходят в воздушную среду и её ионизируют. Возникающее при этом рекомбинационное излучение воздушной среды регистрируется и свечение воздуха даёт картины стереографических проекций, анализируя которые, можно оценить характер движения электронов через объёмную часть капли раствора и её поверхность, а, значит, получить возможность оценки геометрических параметров молекулярных комплексов, формирующих каналы облегченного движения, зарядового состояния водных ассоциатов, их ближнего порядка – см. [7-10] и литературу там же. В результате особенности расположения каналов позволяют судить о типе надмолекулярной организации раствора, характере взаимодействия каналируемых зарядов с молекулярными комплексами, образующими стенки каналов. В настоящее время такие данные позволили выявить особенности каналирования электронов в суспензиях биологических объектов, характеризующихся различным функциональным состоянием калиевых и кальциевых каналов клеточной оболочки эритроцитов, вызванных действием агонистов и антигонистов этих каналов [7,10-12].

В настоящей работе изучены возможности использования параметров электронной эмиссии для выяснения особенностей позиционного порядка молекулярных комплексов в водных растворах новокаина и лидокаина, обеспечивающих их фармакологические свойства.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

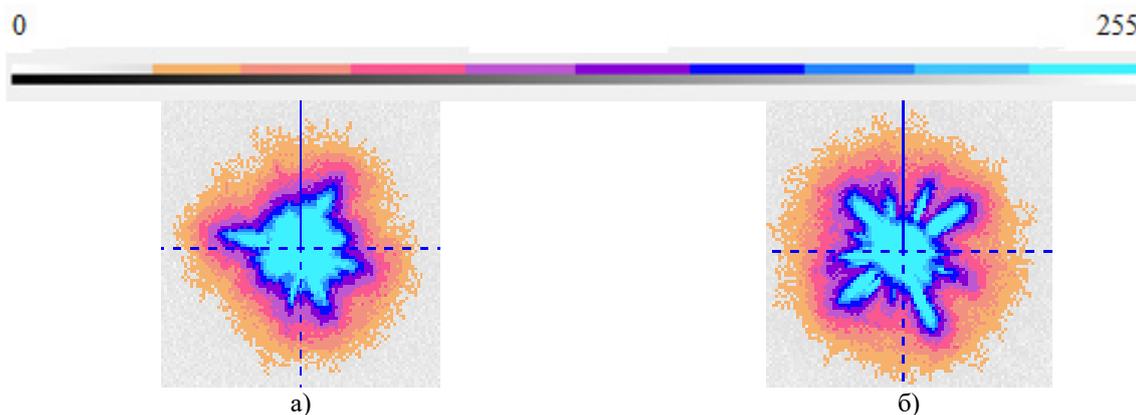
Объектами исследования служили широко используемые в медицинской практике 0,5% водный раствор новокаина  $C_{13}H_{20}O_2N_2 \cdot HCl$ , содержащий 5 мг прокаина гидрохлорида, 0,1 моль раствор хлористоводородной кислоты и 0,2% раствор лидокаина  $C_{14}H_{22}N_2$ . Образцы, используемые в медицинской практике на основе новокаина: 0,5% раствор новокаина, содержащий 5 мг прокаина гидрохлорида, 0,1 моль раствора хлористоводородной кислоты, воду pH 3,8-4,5. Образцы, используемые в медицинской практике на основе лидокаина: лидокаин-буфус: лидокаина гидрохлорида 20 мг и вспомогательные вещества: NaCl 6 мг, 0,1 моль раствора гидрохлорида натрия.

Для изучения ориентационного и позиционного порядков молекулярных ассоциатов в таких растворах использовали метод газоразрядной визуализации (ГРВ). Исследования выполнены на приборе «ГРВ-камера» медицинского назначения [6-8,10]. ГРВ-изображения фиксировались чувствительной фото-видео камерой в диапазоне световых частот с расширением чувствительности в фиолетовой и ультрафиолетовой областях с использованием кварцевого стекла. Анализ параметров картин ГРВ-изображений растворов выполнялся с использованием программы GDV Scientific Laboratory. Исследуемые растворы помещали в модифицированный инсулиновый шприц, в котором находился металлический электрод, эмитирующий электроны, проходящие через каплю жидкости. Электроны, ускоренные импульсным электрическим полем (напряжённость  $4,5 \cdot 10^6$  В/м, частота 1024 Гц, время одного импульса около  $4 \cdot 10^{-6}$  с), порождали электронные лавины, ионизирующие воздух и вызывающие его свечение. Свечение, регистрируемое фотокамерой, переводилось системой видеопреобразования в цифровой код, и визуализировалось на экране компьютера в виде совокупности стримеров, связанных со стереографическими проекциями следов движения электронов, т.е. с каналами облегченного движения в водном растворе и с поверхности капли. Параметрический анализ свечения при усреднении картин такого свечения от 10 капель раствора, представлял информацию о параметрах эмиссии электронов с их поверхности и объёмной части. Угловые зависимости интенсивности стримеров воспроизводили стереографические проекции направлений (каналов) облегченного движения электронов, что позволило определить особенности пространственного распределения молекулярных ассоциатов, а также оценить интенсивность взаимодействия электронов с молекулярными комплексами, формирующими стенки каналов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Усреднённые картины газоразрядного свечения (интенсивная палитра) растворов новокаина и лидокаина приведены на рисунке 1. Картина свечения водного раствора новокаина с концентрацией 0,5% представляет собой светлый диск, обусловленный ионизацией воздуха электронами, эмитированными с поверхности капли, и стримеров одинаковой длины и интенсивности, обусловленных ионизацией воздуха электронами, прошедшими через объёмную часть капли. Картина свечения водного раствора лидокаина отличается наличием, кроме четырёх основных, двух дополнительных стримеров малой длины и слабой интенсивности. Учитывая то, что основными элементами растворов лекарственных средств являются молекулярные комплексы, формируемые основными и вспомогательными веществами, можно предположить, что их пространственное расположение упорядочено и они формируют каналы для облегченного движения электронов. На это указывает угловое распределение электронов, прошедших через каплю водных растворов новокаина и лидокаина. Картины углового распределения электронов для двух концентраций лекарственных средств приведены на рисунке 2.

Из рисунка 2 видно, что количество, параметры и угловые положения максимумов зависят не только от типа основного лекарственного средства, но и от концентрации раствора. В частности, положение четырёх основных максимумов, их ширина и относительные интенсивности для растворов новокаина и лидокаина не совпадают.



**Рисунок 1.** Цветокodированные картины интенсивности газоразрядного свечения растворов новокаина (а) и лидокаина (б) (интенсивная палитра). Сплошная вертикальная линия указывает начало отсчёта угловых распределений (отсчёт по часовой стрелке,  $0^\circ$ ) – см. рисунок 2, а пунктирными линиями указаны углы, кратные  $90^\circ$ , отсчитываемые от вертикальной линии. На верхней строке представлена шкала интенсивностей

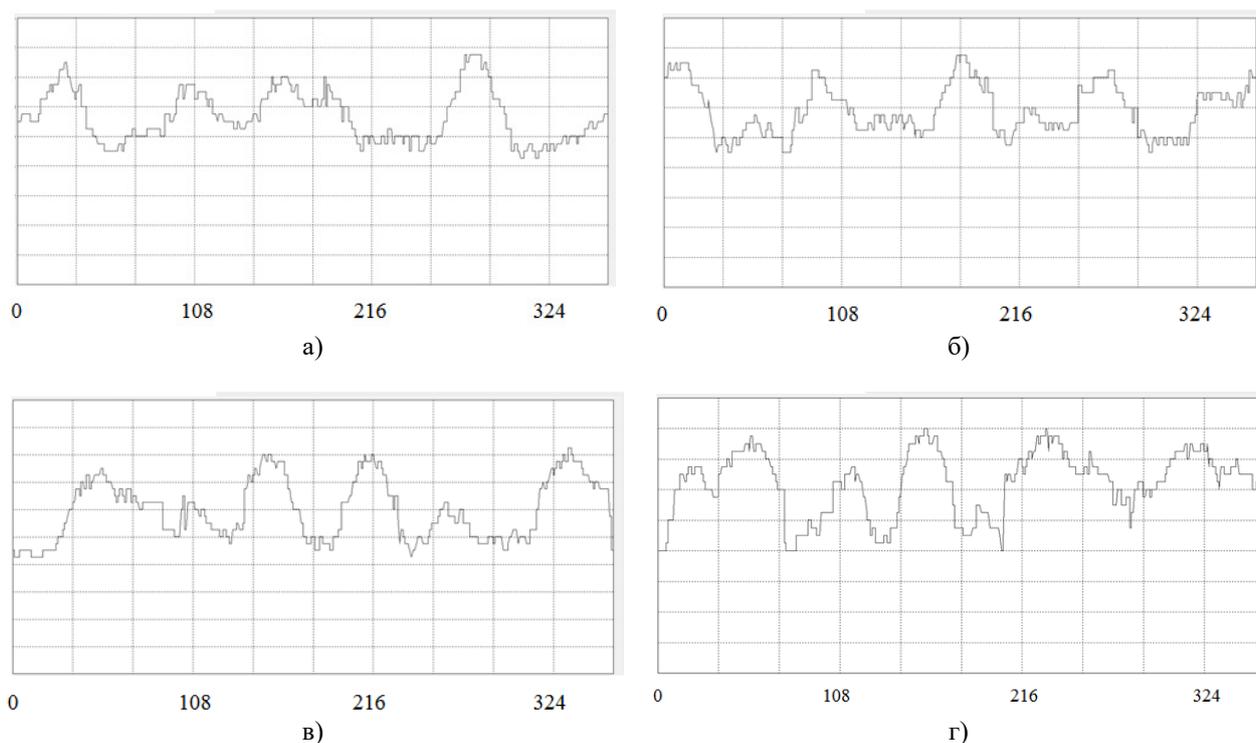
Это может быть обусловлено неодинаковыми геометрическими параметрами каналов транспорта электронов через существующие ион-проводящие каналы. Более того, наличие дополнительных максимумов на картине углового распределения интенсивности электронной эмиссии указывает на формирование дополнительных каналов облегчённого движения, образованных вспомогательными веществами, присутствующими в растворах. Их количество определяется в большей степени концентрацией препаратов в растворе и химическими особенностями молекулярных вспомогательных веществ. Действительно, на картине углового распределения электронов, прошедших через каплю раствора хлорида натрия, не наблюдается максимумов, указывающих на наличие направлений облегчённого движения. В то же время, наличие дополнительных максимумов указывает на растворы дополнительных веществ, присутствующих в лидокаине. Выполненные нами расчёты показывают, что при диаметре капли 3 мм и расстояниями между мениском капли и кварцевым электродом 2 мм, ширина каналов, формируемых молекулярными комплексами новокаина и лидокаина, различается и составляет  $(3-4) \cdot 10^{-4}$  мм. В то же время, расстояние между каналами составляет  $(1-2) \cdot 10^{-4}$  мм, что несколько меньше диаметра сферических мицелл во многих структурированных коллоидных растворах [13]. Учитывая, что направления облегчённого движения совпадают с направлением плотно упакованных рядов плоскостей, образованных молекулярными ассоциатами, следует, что в изученных растворах с указанной концентрацией лекарственных средств таких плоскостей четыре. Однако, исходя из расстояния и ширины максимумов, можно судить о различных особенностях позиционного порядка в расположении молекулярных ассоциатов в этих препаратах. Более того, различное количество максимумов электронной эмиссии и их неодинаковое угловое положение свидетельствует об анизотропии их формы, а также о полидисперсности молекулярных ассоциатов. Неодинаковая степень изрезанности склонов максимумов свидетельствует о различном характере взаимодействия электронов со стенками каналов. Это может обеспечивать различную эффективность транспорта электронов через существующие ион-проводящие каналы и, как следствие, транспорта положительных ионов  $\text{Na}^+$ .

Различия в состоянии ион-проводящих каналов в водных растворах новокаина и лидокаина отчётливо прослеживаются и на параметрах свечения их капель. В таблице 1 приведены значения параметров свечения, которые позволяют выявить различия в позиционном порядке и геометрических характеристиках молекулярных ассоциатов в растворах.

Из приведённых в таблице 1 данных видно, что наиболее заметные различия наблюдаются для площади, интегральной интенсивности и энергий эмитируемых электронов. Учитывая тот факт, что площадь свечения определяется количеством и энергией эмитируемых электронов [8], можно заключить, что средняя энергия электронов, эмитируемых через раствор лидокаина, существенно выше, чем аналогичная величина для раствора новокаина. Это находится в соответствии с результатами вычисления средней энергии электронов, эмитируемых каплями изученных растворов.

**Таблица 1.** Значения параметров электронной эмиссии ГРВ растворов лекарственных средств новокаина и лидокаина

Раствор	Концентрация	Площадь свечения, пиксель	Средняя интенсивность свечения, отн. ед.	Энтропия свечения, отн. ед.	Коэффициент фрактальности, отн. ед.
Новокаин	Менее 0,5%	4592	106,3	2,52	1,799
	0,5%	4835	104,4	2,67	1,825
Лидокаин	Менее 0,2%	5344	104,6	2,627	1,785
	0,2%	5288	102,2	2,668	1,773



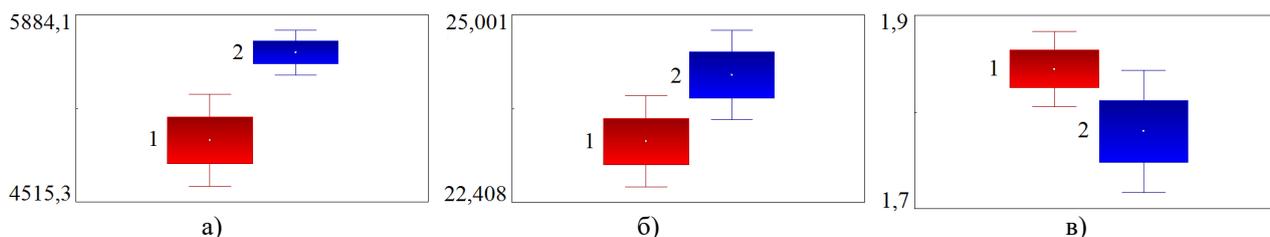
**Рисунок 2.** Угловые интенсивности газоразрядного свечения, вызванного электронами, прошедшими через капли водных растворов для различных концентраций лекарственных средств: новокаин, менее 0,5% водный раствор (а); новокаин, 0,5% водный раствор (б); лидокаин-буфус, менее 0,2% (в); лидокаин-буфус 0,2% раствор (г). По осям абсцисс отложены углы, градусы; по осям ординат – интенсивности свечения, отн. ед.

Причиной таких различий может быть различие в позиционном порядке и в размерах молекулярных ассоциатов, обеспечивающих различный характер взаимодействия электронов с молекулярными комплексами, формирующими стенки каналов облегченного транспорта последних через растворы [14]. Вследствие этого возможно торможение или ускорения электронов как внутренним электрическим полем каналов, так и их электростатическим взаимодействием с молекулярными комплексами.

Несмотря на тот факт, что эффективность транспорта электронов зависит от зарядового состояния молекулярных комплексов, напряженности электрического поля внутри канала, параметров водной среды, лимитируемых вспомогательными веществами, по изменению энергетического спектра эмитируемых электронов можно судить о степени селективности каналов по отношению к проводимости ионов  $\text{Na}^+$ . На это указывают и результаты статистического сравнения параметров картин ГРВ, представленных на рисунке 3 [15].

Из рисунка 3 следует, что по данным применения критерия Стьюдента для 10 капель каждого из растворов наблюдаются статистически различимые значения площадей, суммарных интенсивностей, фрактальности по изолинии, указывающие на существенное влияние зарядового состояния, размеров и структурной локализации молекулярных комплексов лекарственных средств на процессы каналирования электронов, а, следовательно, и ионов  $\text{Na}^+$ . В то же время отсутствие статистических различий в значениях энтропии указывает на близкие значения степеней упорядочения молекулярных ассоциатов, т.е. близкие их структурные локализации. Вместе с тем лидокаин более заметно снижает проводимость положительных ионов  $\text{Na}^+$  в сравнении с новокаином.

Специфика в количестве каналов, в их параметрах может позволить выяснить механизм использования лидокаина в качестве аритмических средств, оценить оптимальное количество лекарственного препарата в водной среде для получения максимального эффекта, оценить влияние внешних факторов на состояние каналов [16].



**Рисунок 3.** Результаты статистического сравнения площадей свечения (а), суммарной интенсивности свечения (б), фрактальности по изолинии (в) – для новокаина (1) и лидокаина (2)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования указывают на возможность применения метода газоразрядной визуализации для анализа эффективности блокирования каналов облегчённого движения ионов  $\text{Na}^+$  в растворах анестетиков лидокаина и новокаина. Такие возможности связаны с тем, что при движении электронов, а, следовательно, и ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , происходит изменение характера их движения: их торможение или ускорение внутренним электрическим полем каналов, а также кулоновским взаимодействием с заряженными молекулярными комплексами препаратов, образующих такие каналы. Результаты исследований указывают на заметные различия в параметрах каналирования зарядов в лидокаине и новокаине. Специфика в количестве каналов, в их параметрах может позволить выяснить механизм использования лидокаина в качестве антиаритмического средства, оценить оптимальное количество лекарственного препарата в водной среде для получения максимального эффекта, оценить влияние внешних факторов на состояние каналов.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Правительства Калужской области № 23-21-10069, <https://rscf.ru/project/23-21-10069/>, <https://rscf.ru/en/project/23-21-10069/>.*

#### **Список литературы / References:**

1. Матвеев А.В., Крашенинников А.Е., Егорова Е.А., Матвеева Е.А. Анализ эффективности и безопасности лидокаина (обзор литературы). *Сибирский научный медицинский журнал*, 2020, т. 40, № 6, с. 12-22 [Matveev A.V., Krasheninnikov A.E., Egorova E.A., Matveeva E.A. Analysis of the efficacy and safety of lidocaine (literature review). *Siberian Scientific Medical Journal*, 2020, vol. 40, no. 6, pp. 12-22, doi: 10.15372/SSMJ20200602 (In Russ.)].
2. Harrison E.E. Lidocain in prehospital counter-shock refractory ventricular fibrillation. *Ann. Emerg. Med.*, 1981, vol. 10, no. 8, pp. 420-423, doi: 10.1016/s0196-0644(81)80309-5.
3. Link M.S., Berkow L.C., Kudenchuk P.J., Halperin H.R., Hess E.P., Moitra V.K., Neumar R.W., O'Neil B.J., Paxton J.H., Silvers S.M., White R.D., Yannopoulos Demetris, Donnino M.W. Part 7: Adult advanced cardiovascular life support. 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*, 2015, vol. 132, suppl. 2, no. 18, pp. S444-S464, doi: 10.1161/CIR.0000000000000261.
4. De Long R.H. *Physiology and Pharmacology of local anaesthesia*. Springfield, 1970, 180 p.
5. Высоцкий В.И., Карлаш А.Ю. Особенности селективного транспорта и каналирования ионов в водной среде в каналах биологических мембран. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2010, № 12, с. 64-71 [Vysotsky V.I., Karlash A.Yu. Features of Selective Transport and Ions Channeling in Water Environment in Channels of Biological Membranes. *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2010, no. 12, pp. 64-71 (In Russ.)].
6. Коротков К.Г., Орлов Д.В., Величко Е.Н. Применение метода газоразрядной визуализации для анализа различных жидкостей. *Изв. вузов, Приборостроение*, 2011, т. 54, № 12, с. 40-46 [Korotkov K.G., Orlov D.V., Velichko E.N. Application of the gas discharge imaging method for the analysis of various liquids. *Bul. of universities, Instrument engineering*, 2011, vol. 54, no 12, pp. 40-46 (In Russ.)].
7. Масленникова О.М., Шипко М.Н., Сибирев А.Л., Степович М.А., Никонорова В.Г. О диагностическом потенциале метода газоразрядной визуализации в оценке эффективности препаратов для лечения сердечно-сосудистой патологии. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*, 2020, № 4, с. 91-96 [Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Stepovich M.A., Nikonorova V.G. On a diagnostic potential of gas-discharge imaging technique in evaluating the effectiveness of pharmaceutical preparations in cardiovascular diseases. *Kremlin Medicine Journal*, 2020, no. 4, pp. 91-96, doi: 10.26269/3r40-r894 (In Russ.)].
8. Коротков К.Г. *Принципы анализа ГРВ биоэлектрографии*. Санкт-Петербург: Реноме, 2007, 286 с. [Korotkov K.G. *Principles of analysis of GDV bioelectrography*. St. Petersburg: Renome, 2007, 286 p. (In Russ.)].
9. Шипко М.Н., Усольцева Н.В., Сибирев А.Л., Масленникова О.М., Смирнова А.И., Степович М.А., Габдулсадыкова Г.Ф. Влияние импульсных электромагнитных полей на позиционный и ориентационный порядок в водных растворах цетилтриметиламмония бромистого. *Жидкие кристаллы и их практическое использование*, 2018, т. 18, № 1, с. 47-54 [Shipko M.N., Usol'tseva N.V., Sibirev A.L., Maslennikova O.M., Smirnova A.I., Stepovich M.A., Gabdulsadykova G.F. Influence of pulsed electromagnetic fields on positional and orientational ordering in aqueous solutions of cetyltrimethylammonium bromide (СТАВ). *Liquid crystals and their practical use*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 47-54, doi: 10.18083/LCAppl.2018.1.47 (In Russ.)].
10. Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Шипко М.Н., Степович М.А. Об информативных возможностях и результатах экспериментальных исследований ГРВ-визуализации белок-индуцированных молекулярных комплексов в водных растворах таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- $\gamma$ . *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 1, с. 84-88 [Maslennikova O.M., Sibirev A.L., Shipko M.N., Stepovich M.A. On the informative possibilities and results of experimental studies of GDV visualization of protein-induced molecular complexes in aqueous solutions of tablet preparations containing antibodies to interferon- $\gamma$ . / *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, vol. 8, no. 1, pp. 84-88, doi: 10.29039/rusjbp.2023.0593 (In Russ.)].
11. Frieden M., Malli R., Samardzija M., Demarex N., Graier W.F. Subplasmalemmal endoplasmic reticulum control  $\text{KCa}$  channel activity upon stimulation with a moderate histamine concentration in a human umbilical vein endothelial cell line. *J. Physiol.*, 2002, vol. 540, pt. 1, pp. 73-84.

12. Doyle D., Morais-Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J., Cohen S., Chait B., MacCinnon R. The structure of potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 1998, vol. 280, no. 5360, pp. 69-77, doi: 10.1126/science.280.5360.69.

13. Соколова Т.А., Доронин С.Ю. Фотометрическое определение новокаина с предварительным концентрированием мицеллами ПАВ. *Журнал аналитической химии*, 2022, т. 77, № 8, с. 714-720 [Sokolova T.A., Doronin S.Yu. Photometric determination of novocaine with preliminary concentration by surfactant micelles. *Journal of Analytical Chemistry*, 2022, vol. 77, no. 8, pp. 714-720, doi: 10.31857/S0044450222080151 (In Russ.)].

14. Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А. Кальциевые ионные каналы. Часть II. *Забайкальский медицинский вестник*, 2016, № 1, с. 93-104 [Pushkarev B.S., Vitkovsky Yu.A. Calcium ion channels. Part II. *Transbaikal Medical Bulletin*, 2016, no. 1, pp. 93-104 (In Russ.)].

15. Горбунов А.М., Ильенко В.А., Владимирова Е.С. Исследование фармакологической активности препаратов методом оптической спектроскопии. *Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: Научные труды VIII международного конгресса*, Т. 8. СПб, 2018, с. 167-168 [Gorbunov A.M., Ilyenko V.A., Vladimirova E.S. Study of pharmacological activity of drugs by optical spectroscopy. *Weak and ultraweak fields and radiation in biology and medicine: Scientific works of the VIII international congress*, vol. 8, St. Petersburg, 2018, pp. 167-168 (In Russ.)].

16. Khodov I.A., Belov K.V., Sobornova V.V., Dyshin A.A., Kiselev M.G. Exploring the temperature-dependent proportions of lidocaine conformers equilibria in supercritical carbon dioxide via NOESY. *Journal of Molecular Liquids*, 2023, vol. 387, art. no. 122620, doi: 10.1016/j.molliq.2023.122620.

## ON THE POSSIBILITY OF USING THE GAS-DISCHARGE VISUALIZATION METHOD TO ASSESS THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF AQUEOUS SOLUTIONS OF DRUGS

Shipko M.N.<sup>1</sup>, Sibirev A.L.<sup>1</sup>, Maslennikova O.M.<sup>2</sup>, Stepovich M.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lenin Ivanovo State Power Engineering University  
*Rabfakovskaya St., 34, Ivanovo, 153025, Russia*

<sup>2</sup>Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs  
*Marshal Timoshenko St., 19, bld. 1A, Moscow, 121359, Russia*

<sup>3</sup>Tsiolkovsky Kaluga State University  
*Stepan Razin St., 26, Kaluga, 248023, Russia; e-mail: m.stepovich@rambler.ru*

Received 09.08.2024

**Abstract.** The paper considers the features of kilovolt electron channeling in aqueous solutions of novocaine and lidocaine. To study the orientational and positional orders of molecular associates in such solutions, the gas-discharge visualization method was used. Kilovolt electrons accelerated by a pulsed electric field passed through an aqueous solution of novocaine and lidocaine. Electrons released from a drop of solution ionized the air and caused it to glow. The glow was recorded by a sensitive photo-video camera in the range of light frequencies with an expansion of sensitivity in the violet and ultraviolet regions using quartz glass. Gas-discharge images were converted by a video conversion system into a digital code and visualized on a computer screen as a set of streamers associated with stereographic projections of electron motion traces, i.e. with channels of facilitated motion in an aqueous solution and from the drop surface. Analysis of the parameters of gas-discharge image patterns of solutions was performed using the GDV Scientific Laboratory program. Using the gas discharge visualization method, it was shown that the molecular complexes formed by these basic drugs with water and excipients form channels of facilitated electron movement. It was found that the electric field inside the channels and the Coulomb interaction of electrons with the molecular complexes of lidocaine provide higher energy of electrons emitted from the liquid and, as a consequence, higher efficiency of inhibition of positive Na<sup>+</sup> ions, compared to electrons that passed under the same conditions through a drop of solution with novocaine.

**Key words:** *aqueous solution, novocaine, lidocaine, accelerated electrons, channeling, gas discharge visualization.*

## ОСНОВНЫЕ ЗАВИСИМОСТИ ПРИ КОРРЕЛЯЦИОННОМ ИЗМЕРЕНИИ ТЕПЛООВОГО АКУСТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Грановский Н.В.<sup>1</sup>, Аносов А.А.<sup>1,2</sup>, Ерофеев А.В.<sup>1,2</sup>, Мансфельд А.Д.<sup>3</sup>, Беляев Р.В.<sup>3</sup>,  
Казанский А.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)  
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: granovsky\_nikita@mail.ru

<sup>2</sup> Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН  
ул. Моховая, 11/7, г. Москва, 125009, РФ

<sup>3</sup> Институт прикладной физики РАН  
ул. Ульянова, 46., г. Нижний Новгород, 603950, РФ  
Поступила в редакцию 09.08.2024

**Аннотация.** В ряде медицинских процедур, таких как гипертермия и термоабляция, а также при диагностике, включая раннюю, необходимо проводить безболезненные неинвазивные измерения внутренней температуры тела. Это особенно актуально при контроле за доставкой лекарств с помощью термолипосомальных оболочек и других методик. На сегодняшний день одним из рассматриваемых подходов является пассивная акустическая термометрия, которая основывается на регистрации теплового акустического излучения, естественно возникающего в организме человека. В данной статье проводили эксперименты по измерению корреляции теплового акустического излучения, используя две приемные установки. В ходе работы изменялись параметры источников, включая их размеры и расположение, а также расстояние до получателей данных. С использованием формул, применяемых в радиоастрономии, были вычислены кросскорреляционные функции теплового акустического излучения. Результаты экспериментов и расчеты параметров кросскорреляционных функций оказались схожими, что подтверждает допустимые пределы погрешности измерений. Кроме того, была проведена оценка корреляции акустического излучения с помощью системы из трех датчиков, что позволило получить три кросскорреляционные функции для каждой пары сенсоров. Для определения местоположения источника тепла была построена сумма пространственных кросскорреляционных функций для близко расположенных и крайних датчиков. Из-за различий в расстояниях между датчиками, пространственная частота корреляционной функции для крайних датчиков была в два раза выше, чем для соседних. Полученные данные позволили локализовать источник тепла. Планируются дальнейшие исследования с увеличенным количеством приемников в решетке.

**Ключевые слова:** кросскорреляционная функция, тепловое акустическое излучение, восстановление температуры.

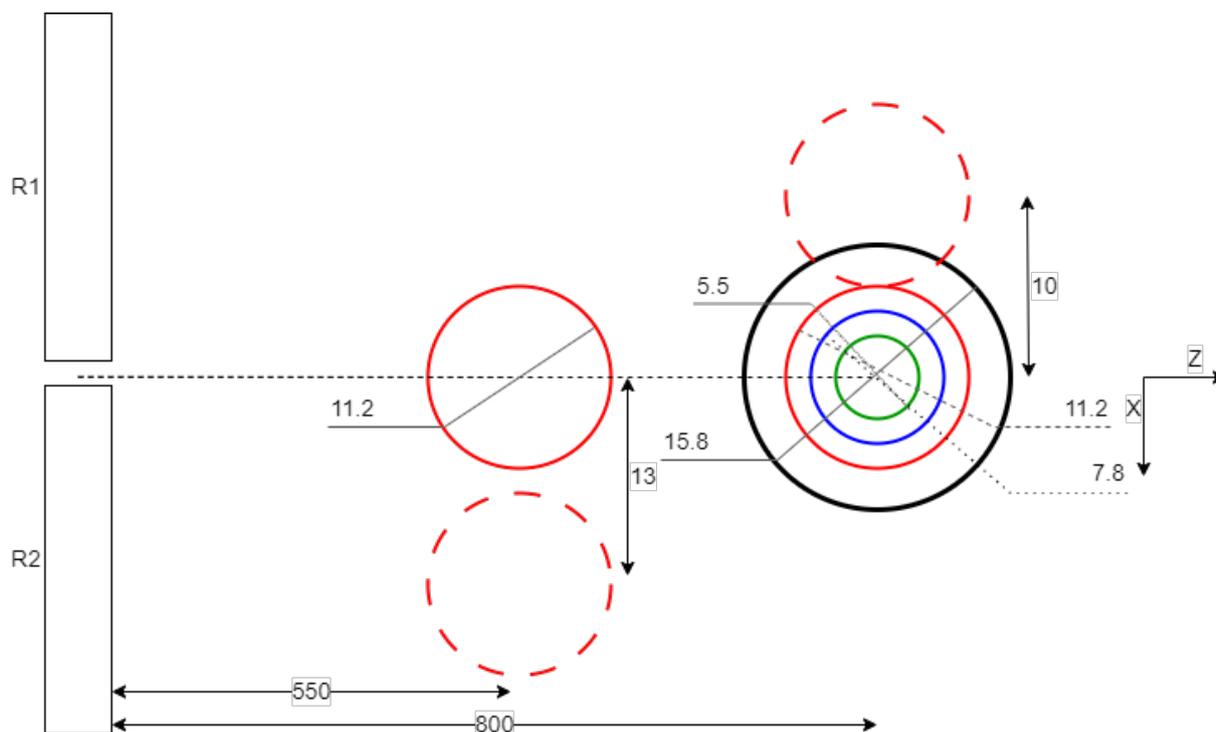
### ВВЕДЕНИЕ

При осуществлении различных медицинских процедур, таких как гипертермия, термоабляция или доставка лекарств в термолипосомах, крайне важно проводить безболезненные и неинвазивные измерения глубокой температуры тела. Для этой цели существует несколько методов, среди которых магнитно-резонансная термометрия [1], считающаяся эталоном, позволяющим восстановить пространственное распределение температуры. Однако ее применение требует дорогостоящего оборудования, высокой квалификации специалистов и специализированных помещений. Поэтому актуальна разработка альтернативных методов, обеспечивающих приемлемую точность измерений.

В этом контексте рассматривается метод пассивной акустической термометрии [2-5], который основывается на анализе теплового акустического излучения для определения внутренней температуры объектов.

Для этого могут использоваться как корреляционные, так и некорреляционные подходы. Корреляционный метод, инициированный Р. Хессемером и Л. Перпер [6], устраняет недостатки традиционных измерений благодаря снижению времени сканирования и повышению пространственного разрешения. Первые эксперименты в этой области проводила группа В.И. Пасечника [7], рассматривающая использование линейной решетки датчиков для восстановления теплового распределения. Результаты получены благодаря коллаборации групп ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН и ИПФ РАН.

В работе [8] рассматривается метод восстановления распределения температуры с применением корреляционного подхода. Предлагается суммировать с различными весами кросскорреляционные функции, полученные с использованием линейной решетки датчиков. Этот подход является вариантом метода, применяемого в радиоастрономии, где две разнесенные антенны работают как пространственный фильтр, настроенный на определенную частоту, а также проверяются формулы, используемые для расчёта кросскорреляционных функций теплового акустического излучения, и исследуется применение метода суммирования кросскорреляционных функций к решетке из трех элементов.



**Рисунок 1.** Схема корреляционного приема теплового акустического излучения парой датчиков R1 и R2. Показано расположение нагретых источников разного диаметра 5,5, 7,6, 11,2 и 15,8 мм, находившихся на расстояниях 550 и 800 мм от приемников. Все размеры указаны в миллиметрах

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

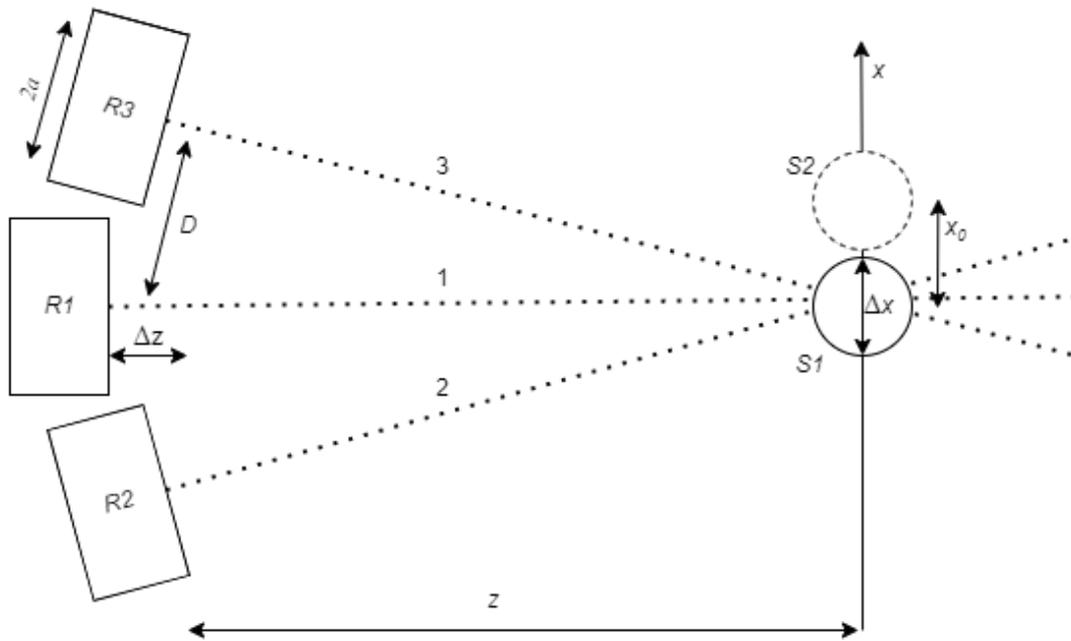
**Экспериментальная установка.** В эксперименте использовали две схемы корреляционного приема: схема с одной парой датчиков показана на рисунке 1, схема с решеткой из трех датчиков показана на рисунке 2. Чтобы избежать «паразитных», не акустических корреляций, мы проводили измерения теплового акустического излучения дважды, с источником и без него. В результате брали разницу между полученными корреляционными функциями.

Акустические датчики квадратного сечения со стороной  $a = 20,0 \pm 0,2$  мм, расстояние между центрами которых  $D = 22,0 \pm 0,3$  мм, находились в аквариуме, заполненном водой при комнатной температуре  $19,6 \pm 0,3$  °С. Оси датчиков лежали в горизонтальной плоскости и пересекались на расстоянии  $z = 550 \pm 3$  мм или  $800 \pm 3$  мм от приемников. В качестве источников теплового акустического излучения использовали расположенные вертикально тефлоновые цилиндры длиной  $142 \pm 1$  мм и диаметрами  $\Delta x = 5,5, 7,6, 11,2, 15,8 \pm 0,1$  мм. Цилиндры были предварительно нагреты до температуры  $55 \pm 0,3$  °С, после чего помещались в аквариум.

В схеме 2 датчики R1, R2, R3 теплового акустического излучения – диаметром  $2a = 14 \pm 0,2$  мм, расстояние между центрами которых  $D = 16 \pm 0,3$  мм, находились в аквариуме, заполненном водой при комнатной температуре  $21 \pm 0,3$  °С. Оси датчиков 1, 2, 3 лежали в горизонтальной плоскости и пересекались на расстоянии  $z = 550 \pm 3$  мм от приемников. В качестве источника теплового акустического излучения использовали нагретый до температуры  $50 \pm 0,3$  °С тефлоновый цилиндр, длиной  $142 \pm 1$  мм и диаметром  $\Delta x = 10,8 \pm 0,1$  мм, расположенный вертикально в точке пересечения акустических осей.

Отметим, что расстояния от точки источника S1, где пересекаются акустические оси, до приемников были различными. Это объясняется сдвигом  $\Delta z$  приемников в направлении акустической оси системы, который сложно контролировать, но который существенно влияет на кросскорреляционную функцию. Например, сдвиг приемников на 0,4 мм (примерно половина длины волны) приводит к сдвигу корреляционной функции на половину периода. Температуру воды и начальную температуру цилиндров контролировали цифровыми термометрами DS18S20P (Maxim Integrated, Сан-Хосе, США) с точностью 0,3 К. Для схемы, представленной на рисунке 1, время одного измерения составляло 2,5 с, измерения повторяли четыре раза. Для схемы, представленной на рис 2, время измерения составило 4 с, измерения повторялись 5 раз.

Для экспериментальных измерений был использован многоканальный акустотермограф [9,10], разработанный в ИПФ РАН группой под руководством А.Д. Мансфельда (полоса пропускания 0,85–1,9 МГц, пороговая чувствительность при времени интегрирования 10 с – 0,25 К). Принимаемые акустические сигналы



**Рисунок 2.** Схема корреляционного приема теплового акустического излучения решеткой из трех датчиков R1, R2, R3, 1, 2, 3 – оси датчиков, S1, S2 – положения источника, 2a – диаметр датчика, D – расстояние между центрами датчиков, z – расстояние от приемников до источника, Δz – сдвиг приемника в направлении акустической оси системы, x – ось, вдоль которой перемещали источник, Δx – диаметр источника, x<sub>0</sub> – сдвиг источника

преобразовывались в электрические, усиливались и подавались на четырнадцатиразрядный АЦП ADM 414x65M (Insys, Москва, Россия) с частотой дискретизации 15 МГц на один канал. Разработанные программы проводили дальнейшую обработку данных.

**Математическая модель.** Согласно [8,11] кросскорреляционную функцию теплового акустического излучения:

$$K(\tau) = \overline{p_1(t)p_2(t + \tau)} - \overline{p_1(t)} \overline{p_2(t)},$$

где:

t – время,

τ – временной сдвиг,

$\overline{p_1}, \overline{p_2}$  – давления, измеренные датчиками R1 и R2, черта сверху означает усреднение по времени;  $\overline{p_1(t)} = \overline{p_2(t)} = 0$ , для схем, показанных на рисунке 1 и 2, можно представить выражением:

$$K(\tau) \sim T_0 \frac{\sin\left[\frac{\Delta f}{f} \left(\frac{Dx_0}{\lambda z} - f\tau\right)\right] \sin\left(\frac{\pi D\Delta x}{\lambda z}\right)}{\pi \frac{\Delta f}{f} \left(\frac{Dx_0}{\lambda z} - f\tau\right)} \cos\left[2\pi \left(\frac{D}{\lambda} \frac{x_0}{z} - f\tau\right)\right], \quad (1)$$

где:

Δf – полоса пропускания датчика,

λ и f – средняя длина волны и частота принимаемого сигнала,

D – расстояние между датчиками,

z – расстояние от датчиков до источника сигнала,

T<sub>0</sub>, x<sub>0</sub>, Δx – температура, положение центра, поперечный размер источника. Здесь предполагается, что

температура источника T<sub>0</sub> постоянна и апертуры датчиков на расстоянии z совпадают. Множитель  $\frac{\sin\left[\frac{\Delta f}{f} \left(\frac{Dx_0}{\lambda z} - f\tau\right)\right]}{\pi \frac{\Delta f}{f} \left(\frac{Dx_0}{\lambda z} - f\tau\right)}$

определяется конечной полосой Δf пропускания приемника, множитель  $\frac{\sin\left(\frac{\pi D\Delta x}{\lambda z}\right)}{\pi \frac{D\Delta x}{\lambda z}}$  – конечным размером Δx

источника, множитель  $\cos\left[2\pi \left(\frac{D}{\lambda} \frac{x_0}{z} - f\tau\right)\right]$  определяет осциллирующий характер коррелированного сигнала. Отметим, что вертикальный размер источника превышал поперечный размер апертуры датчика, поэтому выражение (1) не зависит от координаты y.

Согласно (1), максимальное значение кросскорреляционной функции в точке пересечения акустических осей x<sub>0</sub> = 0 определяется выражением:

$$T_{AC}(\tau = 0, x_0 = 0) = T_0 \frac{2a}{\pi D} \sin\left(\frac{\pi D\Delta x}{\lambda z}\right). \quad (2)$$

В нашем эксперименте менялись параметры  $\Delta x$  и  $z$ . Поэтому максимальное значение  $A$  кросскорреляционной функции удобно представить в виде:

$$A \sim \sin\left(\pi \frac{D \Delta x}{\lambda z}\right). \quad (3)$$

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки выражения (1) были использованы источники различных размеров, расположенных на разных расстояниях от приемников, а также смещенных вдоль оси  $x$ , перпендикулярной акустической оси. Результаты экспериментов для схемы, представленной на рисунке 1, и расчетов кросскорреляционных функций, полученных по формуле (1), представлены на рисунке 3.

На рисунке 3а показаны кросскорреляционные функции для источников с диаметрами 7,6 и 15,8 мм, находящихся на расстоянии 800 мм от приемников. Как и предполагалось, наибольшее значение кросскорреляции наблюдается у более широкого источника. Для вычисления кросскорреляционной функции использовались указанные параметры источников и частота 1,21 (1,25) МГц для источника с диаметром 7,6 (15,8) мм, а ширина полосы пропускания составила 0,9 МГц. При этих параметрах достигается наилучшее соответствие экспериментальных данных расчетным. Средняя частота, использованная для аппроксимации, составила 1,23 МГц, что на 9% ниже расчетного значения, основанного на акустическом спектре. Также ширина полосы пропускания оказалась меньше расчетной на 14%.

На рисунках 3б и 3в представлены кросскорреляционные функции для источника диаметром 11,2 мм на расстояниях 550 (рис. 3б) и 800 (рис. 3в) мм от приемников с сдвигами на  $13 \pm 2$  мм положительном направлении оси  $x$  (рис. 3б) и  $10 \pm 2$  мм отрицательном направлении оси  $x$  (рис. 3в). Временные сдвиги кросскорреляционных функций составили 0,4 мкс и  $-0,2$  мкс, что соответствует смещениям источника в пространстве на 15 и  $-11$  мм соответственно.

Согласно выражению, связывающему сдвиг  $x$  кросскорреляционной функции в пространстве со сдвигом  $\tau$  во времени:

$$x = \frac{cz}{D} \tau, \quad (3)$$

где:

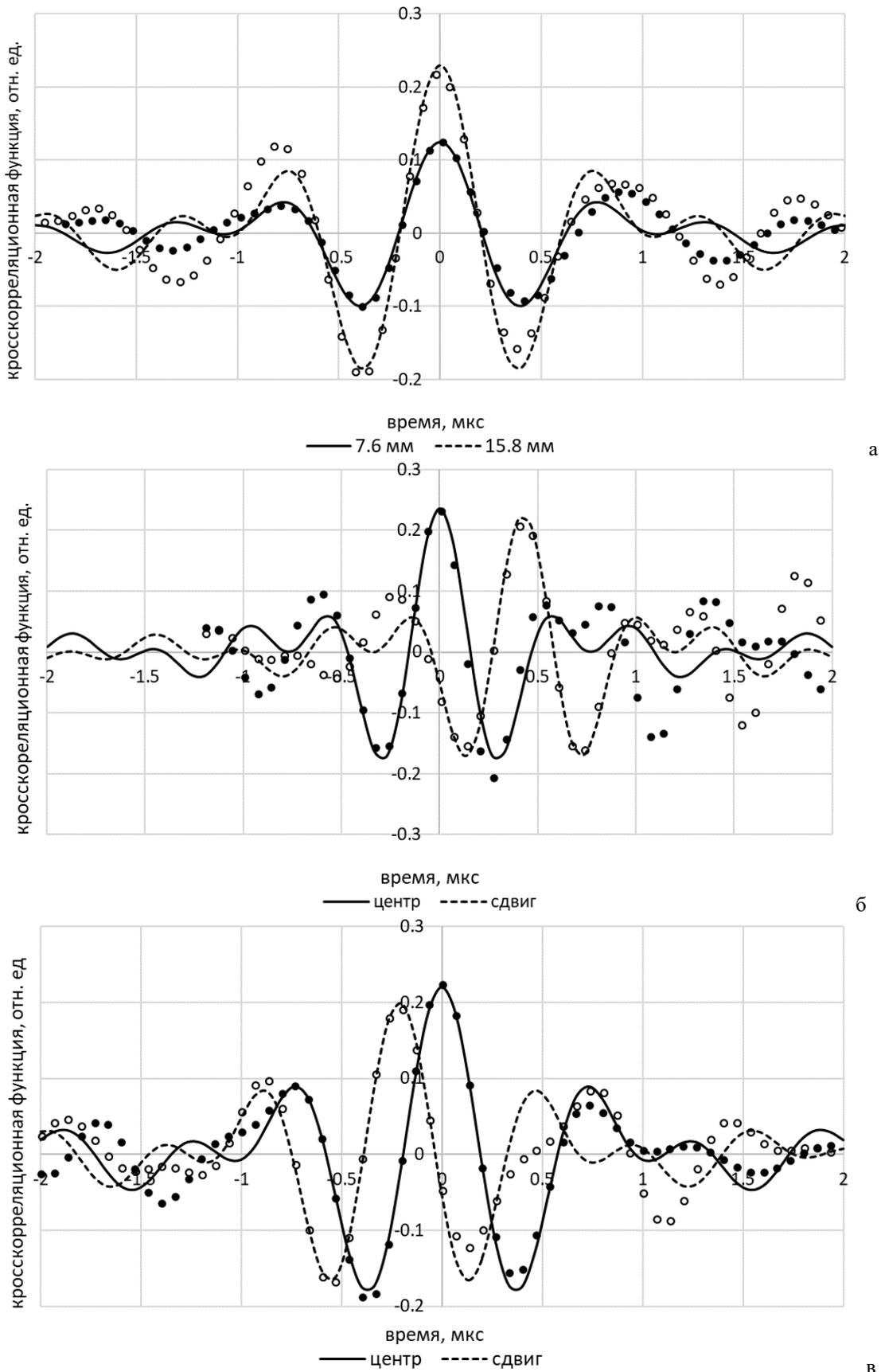
$c = 1500$  м/с; скорость звука в воде, временные сдвиги на 0,4 и  $-0,2$  мкс соответствуют сдвигам источника в пространстве на 15 и  $-11$  мм, что в целом соответствует указанным экспериментальным данным.

Для вычисления кросскорреляционных функций при расстоянии в 550 мм между приемниками и источником (рис. 3б) была выбрана средняя частота 1,6 МГц и полоса пропускания 1,32 МГц как в условиях без сдвига, так и при сдвиге источника. Данные параметры обеспечивают наилучшее соответствие между экспериментальными и теоретическими результатами. При этом средняя частота, используемая для аппроксимации, превышает рассчитанную по акустическому спектру на 19%, а ширина полосы пропускания – на 26%. Когда же расстояние между приемниками и источником увеличивается до 800 мм (рис. 3в), средняя частота в 1,35 МГц совпадает с расчетной по акустическому спектру, тогда как полоса пропускания составляет 0,93 МГц, что на 11% меньше расчетного значения.

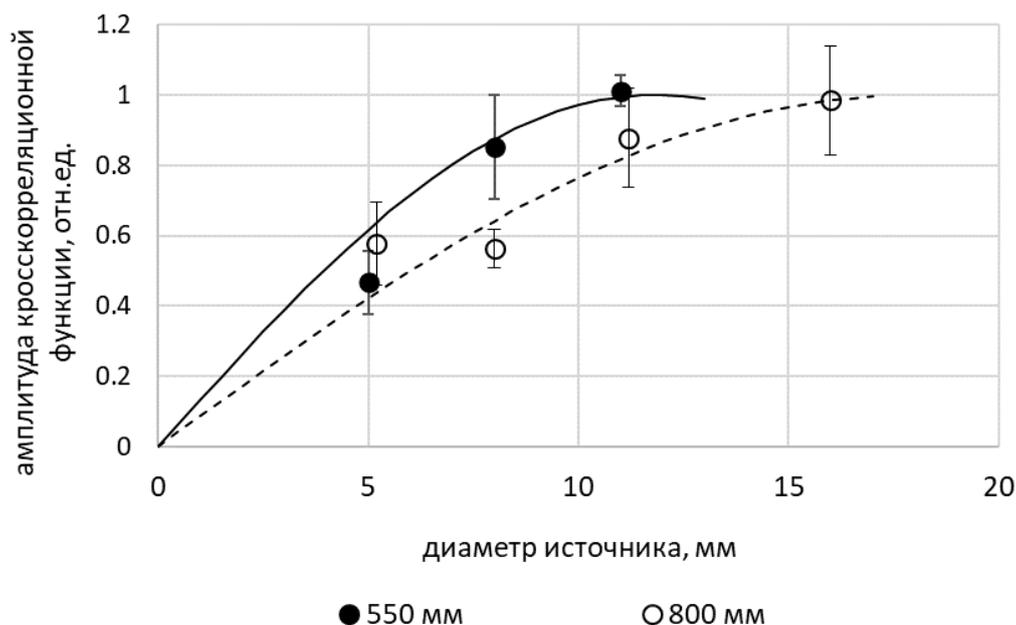
Одной из возможных причин систематических ошибок могут быть асимметричные характеристики реального спектра датчиков, в то время как модель подразумевает симметричность полосы пропускания.

Измеренные и рассчитанные по формуле (2) зависимости максимальных значений (амплитуд) кросскорреляционных функций от диаметра  $\Delta x$  источника для  $z = 550$  и 800 мм представлены на рисунке 4. Из графика видно, что экспериментальные и рассчитанные значения близки с учетом погрешности измерений.

Примеры результатов экспериментов для схемы, представленной на рисунке 2, и расчетов кросскорреляционных функций для решетки датчиков по формуле (1) показаны на рисунке 5. При проведении расчетов мы опирались на параметры конфигурации датчиков, указанные ранее, а также на характеристики их полосы пропускания, которые были получены в процессе построения спектров корреляционной функции. Как видно, результаты расчетов находятся в соответствии с экспериментально полученными данными.



**Рисунок 3.** Экспериментальные (маркеры) и расчетные (линии) кросскорреляционные функции теплового акустического излучения при разных положениях нагретых источников: а) для источников  $\varnothing$  7,6 и 15,8 мм на расстоянии 800 мм от приемников; б) источник  $\varnothing$  11,2 мм на расстоянии 550 мм на акустической оси системы (центр) и сдвинутый в положительном направлении оси  $x$  (сдвиг) на  $13 \pm 2$  мм; в) источник  $\varnothing$  11,2 мм на расстоянии 800 мм на акустической оси системы и сдвинутый в отрицательном направлении оси  $x$  на  $10 \pm 2$  мм



**Рисунок 4.** Экспериментальные (маркеры) и рассчитанные (линии) зависимости амплитуд кросскорреляционных функций от диаметров источников при двух расстояниях между источниками и приемниками 550 и 800 мм. Показана стандартная ошибка

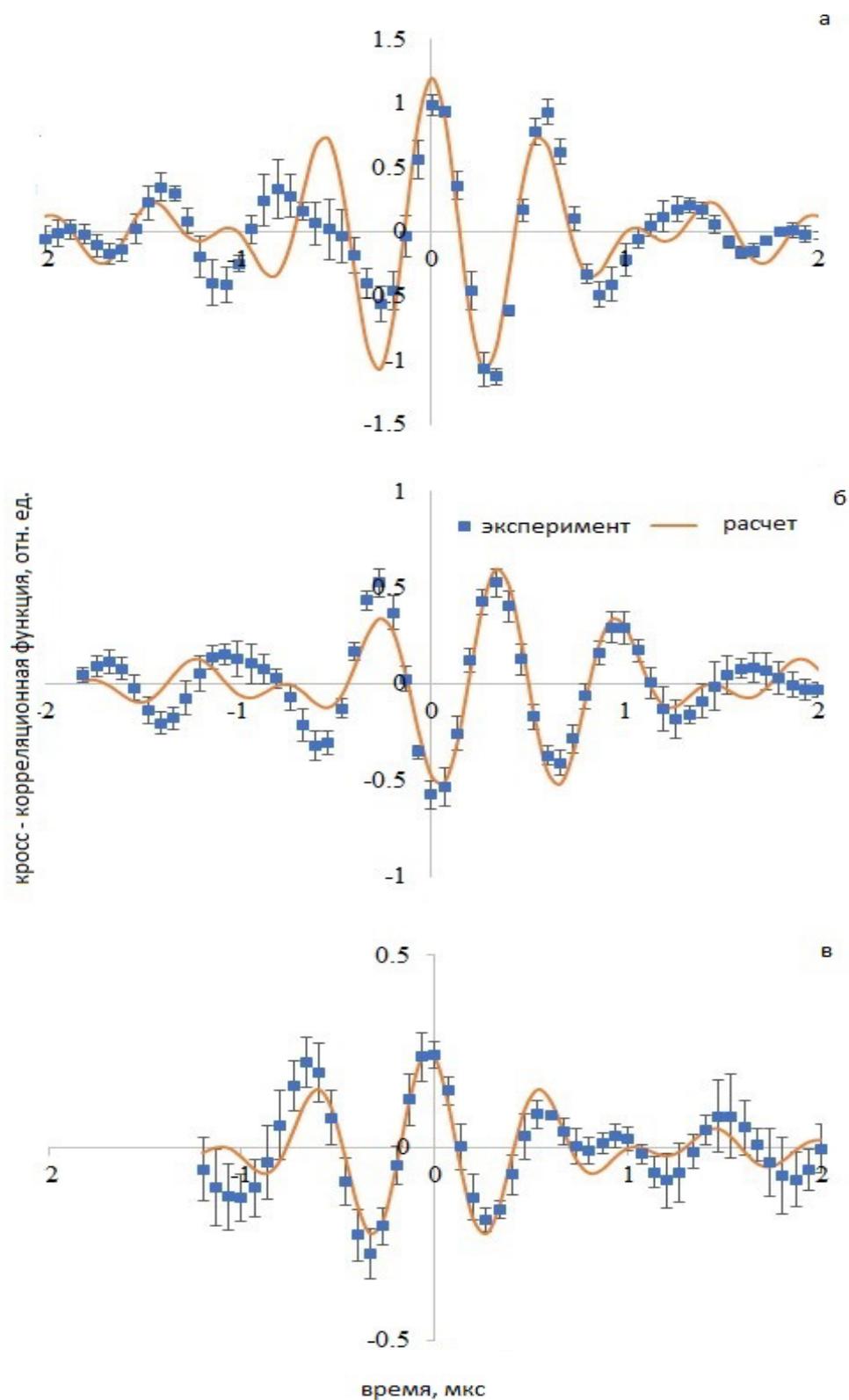
В работе [8] для локализации источника нагрева было предложено складывать кросскорреляционные функции. Спектр корреляционной функции с точностью до числового коэффициента является выделенной частью спектра температурного распределения (с учетом диаграммы направленности приемника). Причем эту выделенную часть можно менять, меняя расстояние  $D$  между приемниками. Переходя от спектров к распределениям, выражение для вычисления распределения температуры:

$$T(x) \operatorname{sinc}^2\left(\frac{2\pi ax}{\lambda z}\right) = \frac{\Delta f}{af} \sum_i D_i T_A(x|D_i),$$

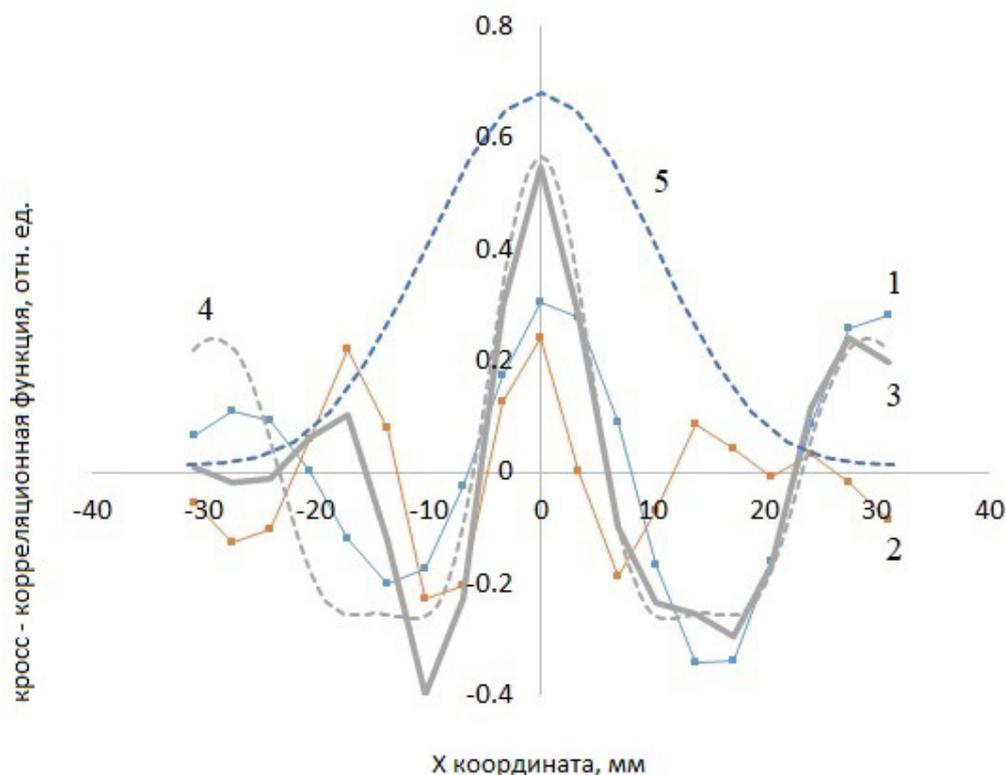
где:

$T_A(x|D_i)$  - корреляционные функции, измеренные для разных значений  $D$ , при замене  $\tau$  на  $x = f\tau z\lambda/D$ . Период временных кросскорреляционных функций датчиков определяется средней частотой приема, которую можно считать одинаковой. Однако, при переходе к пространственному распределению, пространственная частота корреляционной функции зависит от расстояния между датчиками. Суммируя кросскорреляционные функции для соседних и крайних в решетке датчиков при размещении источника в положении S1, можно определить положение нагретого объекта более точно, чем при использовании одного датчика. Представлена сумма экспериментальных данных и расчетов по формуле (1) на рисунке 6, а также показана аппаратная функция широкополосного датчика диаметром 14 мм с полосой пропускания 1,3–2,3 МГц на расстоянии 550 мм от приемника [12].

Сравнение суммы кросскорреляционных функций и аппаратной функции показывает, что корреляционный прием позволяет локализовать нагретую область с большей точностью.



**Рисунок 5.** Рассчитанные и измеренные кросскорреляционные функции теплового акустического излучения, полученные: а) для датчиков R1, R2, источник в центре (S1); б) для R1, R3, источник сдвинут на 11 мм (S2); в) для R2, R3, источник в центре (S1)



**Рисунок 6.** Измеренные пространственные кросскорреляционные функции, полученные для соседних и крайних датчиков R1 и R3 (1), R2 и R3 (2) и их сумма (3). Рассчитанная сумма кросскорреляционных функций (4). Также показана рассчитанная аппаратная функция датчика (5). Источник в положении S1

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Измерения корреляции теплового акустического излучения были осуществлены с использованием пары приемников, при этом изменялись размеры и расположение источников, а также расстояние до приемников. С опорой на формулы из радиоастрономии [11] были вычислены кросскорреляционные функции теплового акустического излучения. Результаты показали, что экспериментальные и теоретические значения параметров кросскорреляционных функций находятся в согласии с учетом допустимых погрешностей.

Кроме того, корреляция теплового акустического излучения была измерена с помощью решетки из трех датчиков, и для каждой пары датчиков были получены все три кросс коррелирующие функции. Для определения местоположения источника была составлена суммарная пространственная кросскорреляционная функция для соседних и крайних датчиков решетки. При этом различие в расстоянии между датчиками привело к тому, что пространственная частота корреляционной функции для крайних датчиков была вдвое выше, чем для составленных пар. Таким образом, с помощью суммирования функций можно выявить местоположение нагретого объекта. В будущем запланированы исследования с использованием решетки из большего числа приемников.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда No 23-22-00175, <https://rscf.ru/project/23-22-00175/>

#### Список Литературы / References:

1. Rieke V. MR thermometry. *Interventional Magnetic Resonance Imaging*, 2011, pp. 271-288.
2. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Дворникова М.В., Дворникова В.В., Казанский А.С., Курятникова Н.А., Мансфельд А.Д. Акустотермометрический контроль кисти человека при гипертермии и гипотермии. *Акуст. журн.*, 2013, т. 59, № 1, с. 109-114 [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Dvornikova M.V., Dvornikova V.V., Kazansky A.S., Kuryatnikova N.A., Mansfeld A.D. Acoustothermometric control of the human hand during hyperthermia and hypothermia. *Acoust. zhurn.*, 2013, vol. 59, no. 1, pp. 109-114 (In Russ.)].
3. Anosov A.A., Subochev P.V., Mansfeld A.D., Sharakshane A.A. Physical and computer-based modeling in internal temperature reconstruction by the method of passive acoustic thermometry. *Ultrasonics*, 2018, vol. 82, pp. 336-344.
4. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Курятникова Н.А., Мансфельд А.Д. Акустотермометрические данные о кровотоке и теплопродукции в предплечье при физической нагрузке. *Акуст. журн.*, 2013, т. 59, № 4, с. 539-544 [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazansky A.S., Kuryatnikova N.A.,

Mansfeld A.D. Acoustothermometric data on blood flow and heat production in the forearm during physical activity. *Acoust. zhurn.*, 2013, vol. 59, no. 4, pp. 539-544 (In Russ.).

5. Аносов А.А., Пасечник В.И., Исрефилов М.Г. Восстановление двумерного распределения внутренней температуры модельного объекта методом пассивной термоакустической томографии. *Акуст. журн.*, 1999, т. 45, № 1, с. 20-24 [Anosov A.A., Pasechnik V.I., Isrefilov M.G. Reconstruction of the two-dimensional distribution of the internal temperature of a model object using passive thermoacoustic tomography. *Acoust. zhurn.*, 1999, vol. 45, no. 1, pp. 20-24 (In Russ.).]

6. Hessemer Jr R.A., Perper L.J. *Correlation thermography*: pat. 4416552 USA, 1983.

7. Аносов А.А., Антонов М.А., Пасечник В.И. Измерение корреляционных свойств теплового акустического излучения. *Акуст. журн.*, 2000, т. 46, с. 28-34 [Anosov A.A., Antonov M.A., Pasechnik V.I. Measurement of correlation properties of thermal acoustic radiation. *Acoust. zhurn.*, 2000, vol. 46, pp. 28-34 (In Russ.).]

8. Аносов А.А., Барабаненков Ю.Н., Казанский А.С., Лесс Ю. А., Шаракшанэ А. С. Обратная задача акустотермографии при корреляционном приеме теплового акустического излучения. *Акустический журнал*, 2009, т. 55, № 1, с. 98-103 [Anosov A.A., Varabanenkov Yu.N., Kazansky A.S., Less Yu.A., Sharakshane A.S. Inverse problem of acoustothermography with correlation reception of thermal acoustic radiation. *Acoustic Journal*, 2009, vol. 55, no. 1, pp. 98-103 (In Russ.).]

9. Мансфельд А.Д. Акустотермометрия. Состояние и перспективы. *Акустический журнал*, 2009, т. 55, № 4-5, с. 546-556 [Mansfeld A.D. Acoustothermometry. Status and prospects. *Acoustic Journal*, 2009, vol. 55, no. 4-5, pp. 546-556 (In Russ.).]

10. Аносов А.А. Одномерная обратная задача пассивной акустической термометрии с использованием уравнения теплопроводности: компьютерное и физическое моделирование. *Акустический журнал*, 2022, т. 68, № 5, с. 562-570 [Anosov A.A. One-dimensional inverse problem of passive acoustic thermometry using the heat equation: computer and physical modeling. *Acoustic Journal*, 2022, vol. 68, no. 5, pp. 562-570 (In Russ.).]

11. Есепкина Н.А., Корольков Д.В., Парийский Ю.Н. *Радиотелескопы и радиометры*. Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1973, с. 19-22 [Esepkina N.A., Korolkov D.V., Pariysky Yu.N. *Radio telescopes and radiometers*. Science. Ch. ed. physics and mathematics lit., 1973, pp. 19-22 (In Russ.).]

12. Аносов А.А., Шаракшанэ А.А., Казанский А.С., Мансфельд А.Д., Санин А.Г., Шаракшанэ А.С. Аппаратная функция широкополосного акустотермометрического датчика. *Акустический журнал*, 2016, т. 62, № 5, с. 616-623 [Anosov A.A. Sharakshane A.A., Kazansky A.S., Mansfeld A.D., Sanin A.G., Sharakshane A.S. Hardware function of wideband acousto-thermometric sensor. *Acoustic Journal*, 2016, vol. 62, no. 5, pp. 616-623 (In Russ.).]

## BASIC DEPENDENCIES IN THE CORRELATION MEASUREMENT OF THERMAL ACOUSTIC RADIATION

Granovsky N.V.<sup>1</sup>, Anosov A.A.<sup>1,2</sup>, Yerofeev A.V.<sup>1,2</sup>, Mansfeld A.D.<sup>3</sup>, Belyaev R.V.<sup>3</sup>, Kazansky A.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

*Trubetskaya St., 8, building 2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: granovsky\_nikita@mail.ru*

<sup>2</sup> V.A. Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS

*Mokhovaya St., 11/7, Moscow, 125009, Russia*

<sup>3</sup> Institute of Applied Physics of RAS

*Ulyanova St., 46., Nizhny Novgorod, 603950, Russia*

Received: 09.08.2024

**Abstract.** In a number of medical procedures, such as hyperthermia and thermal ablation, as well as in diagnosis, including early, it is necessary to carry out painless non-invasive measurements of internal body temperature. This is especially important when monitoring drug delivery using thermoliposomal membranes and other techniques. To date, one of the approaches under consideration is passive acoustic thermometry, which is based on the registration of thermal acoustic radiation naturally occurring in the human body. In this article, experiments were carried out to measure the correlation of thermal acoustic radiation using two receiving installations. During the work, the parameters of the sources were changed, including their size and location, as well as the distance to the data recipients. Using formulas used in radio astronomy, the cross-correlation functions of thermal acoustic radiation were calculated. The experimental results and calculations of the parameters of the cross-correlation functions turned out to be similar, which confirms the permissible limits of measurement error. In addition, the correlation of acoustic radiation was evaluated using a system of three sensors, which made it possible to obtain three cross-correlation functions for each pair of sensors. To determine the location of the heat source, a sum of spatial cross-correlation functions was constructed for closely located and extreme sensors. Due to the differences in the distances between the sensors, the spatial frequency of the correlation function for the extreme sensors was twice as high as for the neighboring ones. The data obtained made it possible to localize the heat source. Further studies are planned with an increased number of receivers in the grid.

**Key words:** cross-correlation function, thermal acoustic radiation, temperature recovery.

## ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КВЧ ДИАПАЗОНА НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ ОРГАНИЗАЦИИ БИООБЪЕКТА

Титов А.С.<sup>1,2</sup>, Полников И.Г.<sup>1</sup>, Титов С.В.<sup>1</sup>, Казаринов К.Д.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН

*проезд Введенского, 1, г. Фрязино, 141190, РФ*

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

*Институтский переулок, 9, г. Долгопрудный, 141701, РФ; e-mail: pashkin1212@yandex.ru*

Поступила в редакцию 10.08.2024

**Аннотация.** В данном докладе представлен теоретический анализ экспериментальных данных по изучению поглощения КВЧ излучения в водных средах и его влияния на клеточный уровень организации биообъекта. Макроскопические движения воды описывались общей системой гидродинамических уравнений, включающей уравнение Навье-Стокса, уравнение теплопередачи и уравнение неразрывности в приближении Буссинеска. В статье обсуждаются некоторые известные механизмы биологической чувствительности КВЧ излучения, предложенные специалистами при изучении данного вопроса. Проанализированы также данные из недавно опубликованных научных статей о регистрации конвекции цитозоля в клетках животных с помощью новых прецизионных флуоресцентных методов. На основании полученных теоретических оценок и собственных экспериментальных результатов предложена гипотеза коррекции движения внутриклеточной жидкости с помощью низкоинтенсивного микроволнового излучения. Цель данной работы – способствовать пониманию физико-биологических процессов, связанных с КВЧ излучением и его потенциальными эффектами на биологические системы. Данное исследование может быть полезным для дальнейшего развития знаний о воздействии высокочастотного излучения на клеточные процессы и биологические системы, а также может быть полезным для разработки новых методов лечения и терапии в медицине.

**Ключевые слова:** поглощение КВЧ излучения водой, гидродинамическая неустойчивость, внутриклеточное движение, прецизионный флуоресцентный метод.

Предлагаемый материал был подготовлен к докладу на 19-й международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-24», состоявшейся в сентябре 2024 г. в Севастополе на базе Севастопольского государственного университета и посвящен исследованию механизмов известного влияния микроволн низкой интенсивности на биологические объекты. Интерес к изучению механизмов действия микроволнового излучения КВЧ диапазона на клетки животных и растений обнаружился довольно давно и до сегодняшнего дня подпитывался все новыми и новыми экспериментальными результатами исследований [1]. Учитывая сложность вопроса оценки и интерпретации экспериментальных данных по изучению биологической чувствительности к микроволнам, полученных различными авторами, становится еще более актуальной задача изучения первичных механизмов воздействия электромагнитного излучения на биообъекты [2]. Кроме того, данные экспериментальных исследований достаточно убедительны для того, чтобы всемирная организация здравоохранения классифицировала ЭМИ микроволнового диапазона как фактор окружающей среды, потенциально канцерогенный для человека. Однако, на данный момент не хватает адекватных научных данных для оценки воздействия на здоровье человека электромагнитных волн миллиметрового диапазона, которые планируется использовать в разрабатываемых устройствах. Тем не менее, в связи с тем, что имеются свидетельства о наличии биофизических механизмов воздействия ЭМИ, которые могут привести к неблагоприятным последствиям для здоровья, представляется необходимым использование принципа предосторожности и принципа “Алара” (минимального риска) при формировании экологических требований к строительству и эксплуатации инфраструктуры планируемых систем 5G и 6G [3]. Также известны положительные результаты использования микроволнового излучения КВЧ диапазона в терапевтических целях [4].

Рассмотрим некоторые механизмы биологической чувствительности КВЧ излучения, предложенные специалистами при изучении данного вопроса. Была предложена модель, которая не ограничивается строением отдельной молекулы, а рассматривает действие КВЧ излучения на клетку с позиций кооперативных свойств субклеточных структур (клеточных мембран) [5]. Предполагается, что в клеточных мембранах существуют колебания дипольных групп, причем на возбуждение этих колебаний затрачивается энергия метаболизма. Теоретическое рассмотрение позволило автору данной работы утверждать, что в такой системе может возникнуть стационарное состояние, в котором энергия, запасается в единственной колебательной моде (Бозе – конденсация). Если скорость распространения звука, определяемая модулем упругости липидного бислоя толщиной 100 Å составляет  $10^5 - 10^6$  см/с, то частота колебаний этой моды как раз соответствует диапазону КВЧ излучения  $10^{11} - 10^{12}$  Гц. Этот теоретический вывод подразумевает возможность взаимодействия КВЧ излучения с мембранной структурой клетки. Авторы работы [6] предлагают описывать осциллирующие полярные объекты внутри биологических клеток, в первую очередь микротрубочки, с помощью кинетических уравнений Фрелиха. Результаты численного исследования кинетических уравнений представлены для случая трех связанных

осцилляторов. Было обнаружено, что большие уровни излучения разрушают главный признак систем Фрѐлиха - энергетическую конденсацию в режиме низкой частоты и система функционирует как преобразователь метаболической энергии в излучение. При более умеренных уровнях излучения могут сосуществовать как энергетическая конденсация, так и значительная радиация. Предложены возможные последствия для физиологии клеток.

По современным представлениям вода является неотъемлемым структурным компонентом биологических мембран. Для молекул воды характерно специфическое взаимодействие, называемое водородной связью. Особенность такого взаимодействия состоит в том, что атом водорода, входящий в состав одной молекулы, образует вторую связь с атомом кислорода другой молекулы, в результате чего обе молекулы объединяются в комплекс, обладающий стабильностью. Известны также модели устойчивых комплексов, состоящих из большего количества молекул воды. Химические соединения, имеющие полярные группы, могут вступать во взаимодействие с молекулами воды и образовывать с ними водородные связи. В работе [7] было выполнено экспериментальное исследование на установке двух идентичных резервуаров, заполненных чистой водой и 0,9% раствором NaCl и соединенных тонкой трубкой. Изменения концентрации NaCl в резервуаре, первоначально заполненном чистой водой, измеряли, контролируя сопротивление раствора в качестве индикатора. Полученные экспериментальные данные показали, что микроволновое воздействие ускоряет процесс диффузии в воде. Время, необходимое для снижения начального сопротивления раствора, было в 1,7 раза короче при использовании микроволн. Этот результат согласуется с предложенным механизмом низкоуровневого микроволнового эффекта: микроволновое излучение, поглощаемое молекулами биполярной воды, вызывает изменения водородных связей между молекулами воды, тем самым влияет на его вязкость и ускоряет диффузию.

В работе [8] предлагаются солитоны, как уединенные волны, для взаимодействия со сложными биологическими структурами, такими как клетки. Резонансы происходят на биполярных участках в структурах биополимеров через возмущения водородных связей. Считается, что солитонный механизм основан на тороидальной опосредованной электрон-фононной связи когерентных стоячих волн на основе идентифицированных связанных осцилляторов. Модели Давыдова, Фрѐлиха, Панга, Луци, Сробара и Синкалы, обсуждаемые в этой статье, описывают клеточный электромагнетизм.

В наших экспериментальных работах, выполненных ранее, были выделены два основных механизма действия микроволнового излучения КВЧ диапазона низкой интенсивности на клетки млекопитающих. Это механизм межфазной конвекции водных сред и механизм структурной перестройки клеточных мембран.

Исследование профиля температуры, образующегося при облучении тонких слоев воды оптическими методами, показало, что распределение температуры при поглощении КВЧ излучения указывает на движение жидкости. В наших экспериментах наблюдался конвективный «факел» в середине кюветы при плотности падающей мощности (ППМ) 20 мВт/см<sup>2</sup>. Механизм конвективного движения в этом случае, очевидно, термогравитационный, т.е. связан со всплыванием нагретых элементов жидкости. иной характер имеет неустойчивость тонких слоев воды, в которых доминирующее влияние оказывает термокапиллярный эффект (межфазная конвекция). Высокое поглощение воды и, следовательно, малая глубина проникновения КВЧ излучения, приводят к тому, что вся падающая мощность поглощается в тонком слое, т.е. в воде появляются градиенты температуры. Можно было видеть, как более светлый слой, температура которого повышена в результате поглощения КВЧ излучения, начинает растягиваться по поверхности, вовлекая в движение жидкость по всей кювете. Излучение падало в данном случае через боковую стенку кюветы.

Однако, в любом случае, при поглощении водой КВЧ излучения появление градиента температуры вызывает градиент поверхностного натяжения и, следовательно, движение жидкости в поверхностном слое. Для количественной оценки порога конвекции в условиях КВЧ облучения мы использовали полярографический метод, основанный на том, что предельный диффузионный ток разряда на электроде какого-либо иона определяется скоростью его поступления к поверхности электрода. Результаты экспериментов свидетельствуют о возрастании полярографического тока для O<sub>2</sub> при КВЧ облучении приэлектродного слоя. В системе с вытеснением кислорода воздуха аргоном эффект КВЧ проявлялся гораздо ярче. Оказалось, что КВЧ облучение при плотности потока мощности 1 мВт/см<sup>2</sup> ускоряет нарастание концентрации O<sub>2</sub> в растворе почти в два раза. Таким образом, следует ожидать, что под действием КВЧ излучения может увеличиваться скорость пассивного переноса ионов и молекул в водных средах за счет изменения гидродинамической устойчивости.

С учетом вышесказанного можно попытаться объяснить эффекты КВЧ излучения в экспериментах с участием химических реакций в мембранах, учитывая возможность ускорения доставки реагентов к месту реакции. Например, скорость накопления продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в суспензии липосом. В результате окисления фосфолипидов увеличивается проницаемость мембран для ионов и других важных биологических веществ (один из механизмов патологии клетки). Независимо от способа инициирования окисления КВЧ излучение приводило к ускорению процессов ПОЛ и дозовая зависимость имела пороговый характер от значений, ниже 1 мВт/см<sup>2</sup>. Предполагается, что данный эффект связан с увеличением скорости доставки кислорода к месту реакции ПОЛ.

Исследовалось также действие КВЧ излучения на УФ-фотолиз дрожжевых клеток. Было обнаружено, что КВЧ излучение низкой интенсивности увеличивает выход из клеток в среду продуктов нуклеопроteidной природы с максимумом поглощения 260 нм. Дозовая зависимость показывает проявление эффекта при интенсивности облучения порядка 1 мВт/см<sup>2</sup> и отсутствие зависимости от мощности излучения при интенсивности 10 мВт/см<sup>2</sup>. Возможно, в данном случае ускорение лизиса при фотохимическом процессе связано

с ускорением процесса переноса продуктов реакции в водной фазе под действием КВЧ излучения. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о таком же увеличении лизиса дрожжевых клеток при механическом перемешивании суспензии, а также имеющиеся литературные сведения о важности гидродинамических эффектов при фотолизе везикулярных структур.

Итак, как следует из приведенных выше результатов наших экспериментальных исследований, КВЧ излучение низкой интенсивности стимулирует ускорение движения водных слоев в модельных мембранных системах [9].

Оценим возможность влияния микроволнового излучения низкой интенсивности на конвекцию в водном растворе. Для этого решим задачу о плотности энергии теплового источника при поглощении водной средой энергии микроволнового излучения в КВЧ диапазоне. Пусть электромагнитная волна падает из области  $x < 0$  нормально к поверхности раздела  $x = 0$  ( $x, y, z$  – лабораторная система координат). Падающая волна считается линейно поляризованной с векторами  $\vec{E}$ , направленным параллельно оси  $z$ , и  $\vec{H}$ , направленным параллельно оси  $x$ . Область пространства  $x < 0$  (воздух) считается непоглощающей.

Запишем уравнения для распространяющейся плоской электромагнитной волны, которые в системе СГС имеют вид [10]:

$$\frac{\partial^2 H}{\partial x^2} = \frac{4\pi\sigma}{c^2} \frac{\partial H}{\partial t} + \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 H}{\partial t^2}, \quad (1)$$

$$\frac{\partial^2 E}{\partial x^2} = \frac{4\pi\sigma}{c^2} \frac{\partial E}{\partial t} + \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2}, \quad (2)$$

где:

$\sigma$  – электропроводность,

$\varepsilon$  – диэлектрическая постоянная,

$c$  – скорость света. При этом граничные условия задаются как:

$$\begin{cases} \sigma \\ \varepsilon \end{cases} = \begin{cases} 0 \\ 1 \end{cases}, x < 0, \quad \begin{cases} \sigma \\ \varepsilon \end{cases} = \begin{cases} \sigma \\ \varepsilon_2 \end{cases}, 0 < x < L. \quad (3)$$

Решение системы уравнений (1) и (2) будет представлять собой комплексные монохроматические волны. При этом на границе раздела  $x = 0$  должны выполняться условия непрерывности тангенциальных составляющих векторов  $\vec{E}$  и  $\vec{H}$ . В первой (индекс 1) области  $x < 0$  решение уравнения (2) описывает две встречные волны, бегущие вдоль оси  $x$ , а именно:

$$E_1 = \hat{E}_{10} e^{i\omega\left(t + \frac{x}{c}\right)} + E_{0z} e^{i\omega\left(t - \frac{x}{c}\right)} \quad (4)$$

Во второй (индекс 2) области  $0 < x < L$  решение уравнения (2) описывает одну волну, а именно:

$$E_2 = \hat{E}_{20} e^{i(\omega t - \hat{k}_2 x)}, \quad (5)$$

где комплексное волновое число  $\hat{k}_2$  задается выражением:

$$\hat{k}_2 = \hat{k}'_2 - i\hat{k}''_2 = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_2 - i \frac{4\pi\sigma}{\omega}}. \quad (6)$$

Выделяя в уравнении (6) действительную  $\hat{k}'_2$  и мнимую  $\hat{k}''_2$  части получим следующие выражения:

$$k'_2 = \frac{\omega}{c} \left( \sqrt{\frac{\varepsilon_2^2}{4} + \left(\frac{2\pi\sigma}{\omega}\right)^2} + \frac{\varepsilon_2}{2} \right)^{1/2}, \quad (7)$$

$$k''_2 = \frac{\omega}{c} \left( \sqrt{\frac{\varepsilon_2^2}{4} + \left(\frac{2\pi\sigma}{\omega}\right)^2} - \frac{\varepsilon_2}{2} \right)^{1/2}. \quad (8)$$

Из граничных условий на границе двух сред при  $x = 0$  следуют равенства для амплитуд волн:

$$\hat{E}_{10} + E_{0z} = \hat{E}_{20} \quad (9)$$

и для амплитуд производных по координате:

$$\frac{\omega}{c} (E_{0z} - \hat{E}_{10}) = \hat{k}_2 \hat{E}_{20}. \quad (10)$$

Решая систему уравнений (9) и (10), получим выражение для амплитуды волны во второй области через амплитуду падающей волны:

$$\hat{E}_{20} = \hat{z} E_{0z}, \quad (11)$$

где:

$\hat{z}$  - комплексный коэффициент прохождения волны по амплитуде. Модуль и фаза коэффициента  $\hat{z} = |\hat{z}| e^{i\varphi}$  задаются как:

$$|\hat{z}| = 2 \left[ \left( 1 + \frac{ck'_2}{\omega} \right)^2 + \left( \frac{ck''_2}{\omega} \right)^2 \right]^{-1/2}, \quad (12)$$

$$\varphi = -\text{arctg} \left[ \frac{ck''_2}{\omega + ck'_2} \right]. \quad (13)$$

Протекание тока в среде (область  $0 < x < L$ ) вызывает выделение джоулевого тепла с плотностью  $W = \sigma (\text{Re } E_2)^2$ . Подставляя в это выражение уравнение (5), получим:

$$\begin{aligned} W &= W_0 e^{-2k''_2 x} \cos^2(\omega t - k'_2 x + \varphi) \\ &= \frac{W_0 e^{-2k''_2 x}}{2} [1 + \cos 2(\omega t - k'_2 x + \varphi)] = W_1 + W_2, \end{aligned} \quad (14)$$

где:

$W_0 = \sigma |z|^2 E_{0z}^2$ . Из уравнения (14) видно, что плотность  $W$  имеет постоянную  $W_1 = W_0 e^{-2k''_2 x} / 2$  и переменную  $W_2 = W_0 e^{-2k''_2 x} \cos 2(\omega t - k'_2 x + \varphi) / 2$  составляющие. Другими словами,  $W$  колеблется около своего среднего значения  $W_1$  с удвоенной частотой  $2\omega$ , при этом величина  $W_1$  определяет поглощение энергии КВЧ поля, которое происходит в слое толщиной  $D = (2k''_2)^{-1}$ . Подставляя в это выражение уравнение (8), получим оценочное выражение для глубины проникновения поля в среду:

$$D = (2k''_2)^{-1} = \frac{c}{\omega\sqrt{2}} \left( \sqrt{\varepsilon_2^2 + \left( \frac{4\pi\sigma}{\omega} \right)^2} - \varepsilon_2 \right)^{-1/2}. \quad (15)$$

Численные оценки для излучения с длиной волны  $\lambda = 8,5$  мм дают значение  $D = 0,3$  мм. При этом параметры  $\varepsilon'_2 = 25$ ,  $\varepsilon''_2 = 33$  и  $\sigma = 6 \cdot 10^{11}$  рассчитывались по формулам:

$$\varepsilon'_2 = \varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_D)^2} + \varepsilon_\infty, \quad (16)$$

$$\varepsilon''_2 = \frac{\omega\tau_D(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)}{1 + (\omega\tau_D)^2}, \quad (17)$$

$$\sigma = \frac{\omega\varepsilon''_2}{4\pi}. \quad (18)$$

В расчетах были использованы следующие значения параметров, соответствующих температуре  $T=30$  °С: статическая диэлектрическая проницаемость  $\varepsilon_s = 76,8$ , высокочастотная диэлектрическая проницаемость  $\varepsilon_\infty = 4,2$  и характерное время дебаевской релаксации  $\tau_D = 7,2 \cdot 10^{-12}$  с.

В эксперименте использовалась кювета высотой  $d = 0,6$  мм, что сравнимо с глубиной проникновения поля  $D$ . Таким образом, можно считать, что источник тепла распределен в жидкости, и существованием тепловых волн можно пренебречь.

**Оценка скорости конвекции.** Поскольку в условии нашего эксперимента при КВЧ облучении можно считать, что энергия электромагнитного поля равномерно поглощается по всей толщине кюветы, то внутренний разогрев жидкости приведет к конвективному движению. Макроскопические движения жидкости описываются общей системой уравнений гидродинамики. Эта система включает в себя уравнения Навье-Стокса, уравнение переноса тепла и уравнение неразрывности, выражающее закон сохранения массы. Наиболее популярной моделью для описания конвекции в жидкостях, основанной на этих трех уравнениях, является приближение Буссинёска. Для несжимаемой жидкости, находящейся в поле тяжести, уравнение Навье-Стокса в приближении Буссинёска имеет вид:

$$\rho_0 \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla P + \eta \Delta \vec{v} + \rho(T) \vec{g}. \quad (19)$$

Здесь:

- $\vec{v}$  - скорость течения,
- $T$  - абсолютная температура,
- $P$  - давление,
- $\eta$  - динамическая вязкость,
- $\vec{g}$  - ускорение свободного падения,

$\nabla$  и  $\Delta$  - операторы набла и Лапласа, соответственно. Часто для зависимости плотности  $\rho(T)$  от температуры применяется линейная аппроксимация  $\rho(T) = \rho_0 (1 - \beta T')$ , где  $\beta$  - коэффициент теплового расширения,  $T' = T - T_0$  отклонение температуры от равновесного состояния,  $\rho_0$  - плотность жидкости при некоторой равновесной температуре  $T_0$ . Поскольку коэффициент теплового расширения и отклонение температуры обычно относительно невелики, то линейное приближение обладает приемлемой точностью в большинстве исследуемых задач.

Подстановка линейной зависимости плотности и перенормировка давления позволяют исключить слагаемое  $\rho_0 \vec{g}$ . Окончательно уравнение (19) принимает вид:

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \nabla) \vec{v} = -\frac{1}{\rho_0} \nabla P + \nu \Delta \vec{v} - \beta T' \vec{g}, \quad (20)$$

где:

- $\nu = \eta / \rho_0$  - коэффициент кинематической вязкости.

Уравнением переноса тепла в случае несжимаемой жидкости при пренебрежении выделяющимся в жидкости теплом (вследствие внутреннего трения) имеет вид [11]:

$$\frac{\partial T}{\partial t} + \vec{v} \nabla T = \chi \Delta T + F, \quad (21)$$

где:  $\chi = \kappa / (\rho_0 c_p)$  - коэффициент температуропроводности,

- $\kappa$  - коэффициент теплопроводности,

- $c_p$  - удельная теплоемкость,

$F$  - слагаемое, обусловленное наличием источника тепла (КВЧ излучение) с мощностью  $W$  (Вт/см<sup>2</sup>), так что  $F = W / (2\rho_0 c_p l)$  [12].

Уравнение неразрывности при этом имеет вид [12,13]:

$$\operatorname{div} \vec{v} = 0. \quad (22)$$

Рассмотрим конвективное движение жидкости в плоском вертикальном слое.

При плоскопараллельном движении отлична от нуля лишь вертикальная составляющая скорости  $v_z$ . Из уравнения неразрывности следует, что  $v_z = v_0(x)$ . Предполагая, что температура также будет зависеть от поперечной координаты  $T' = T'(x)$ , получим из уравнений (20) и (21) уравнения для давления, температуры и скорости. При стационарном движении имеем:

$$\chi \frac{\partial^2 T'}{\partial x^2} + F = 0, \tag{23}$$

$$\frac{\partial P_0}{\partial x} = 0, \quad \frac{1}{\rho_0} \frac{\partial P_0}{\partial z} = \nu \frac{\partial^2 v_0}{\partial x^2} + g\beta T' = C. \tag{24}$$

Здесь:

$C$  – постоянная разделения переменных. Граничные условия для температуры имеют следующий вид. При  $x=0$  граница термостатирована:

$$T'(0) = T'_1, \tag{25}$$

а при  $x=l$  граница теплоизолирована:

$$\left. \frac{\partial T'}{\partial x} \right|_{x=l} = 0. \tag{26}$$

Решая уравнение (23) с данными граничными условиями, находим распределение температуры:

$$T' = -\frac{F}{2\chi} x^2 + \frac{Fl}{\chi} x + T'_1. \tag{27}$$

Из уравнения (24) с учетом решения (27) и граничных условий  $v_0(\pm l) = 0$  находим распределение скорости течения

$$v_0 \approx \frac{g\beta Fl^4}{\chi\nu} \left( 1 - \left( \frac{x}{l} \right)^2 \right) f \left( \frac{x}{l} \right). \tag{28}$$

Из (28) находим оценку для скорости:

$$v_0 \approx \frac{g\beta Fl^4}{\chi\nu} \approx 10^{-6} \text{ м/с}. \tag{29}$$

Значение параметров, используемых при оценке скорости приведены ниже:

- $g = 10 \text{ м/с}^2$ ;
- $\rho_0 = 10^3 \text{ кг/м}^3$ ;
- $c_p = 4,2 \cdot 10^3 \text{ Дж/(кг}\cdot\text{К)}$ ;
- $\chi = 0,6 \text{ Вт/(К}\cdot\text{м)}$ ;
- $\nu = 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ ;
- $\beta = 0,2 \cdot 10^{-6} \text{ 1/К}$

Таким образом, для скорости конвекции в воде, поверхность которой облучается ММ волнами, получена оценка 1 мкм/с, что соизмеримо с размерами клеток организма.

Приведенные в данной работе результаты исследований показывают возможность использования КВЧ облучения низкой интенсивности для регулирования скорости потоков водных растворов в модельных биологических объектах. В тоже время современные данные об экспериментально обнаруженных эффектах движения внутриклеточной цитоплазматической жидкости при наличии градиентов температуры, создаваемых внутриклеточными источниками тепла, подтверждают такую возможность в клетках млекопитающих

*Работа выполнена в рамках государственного задания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН.*

**Список литературы / References:**

1. Казаринов К.Д., Полников И.Г. 50 лет созданию нового направления биомедицинской радиоэлектроники. Академик Н.Д. Десятков. *Электронная техника. СВЧ-техника*, 2023, № 1, с. 58-67 [Kazarinov K.D., Polnikov I.G. 50 years of creation of a new direction in biomedical radioelectronics. Academician N.D. Devyatkov. *Electronic equipment. Microwave technology*, 2023, no. 1, pp. 58-67 (In Russ.)].

2. Казаринов К.Д., Полников И.Г., Власова И.И., Михальчик Е.В., Гусев А.А., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Чеканов А.В. Изучение радикал-генерирующей способности активированных нейтрофилов в эксперименте *in vitro* в условиях микроволнового облучения. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 4, с. 137-141 [Kazarinov K.D., Polnikov I.G., Vlasova I.I., Mikhailchik E.V., Gusev A.A., Baranova O.A., Shchelkonogov V.A., Chekanov A.V. Study of the radical-generating ability of activated neutrophils in an *in vitro* experiment under microwave irradiation. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 137-141 (In Russ.)].
3. Zmyslony M., Bortkiewicz A. et. al. Protection of the population health from electromagnetic hazards – challenges resulting from the implementation of the 5G network planned in Poland. *Medycyna Pracy*, 2019, vol. 71, no. 1, doi: 10.13075/mp.5893.00867.
4. Ордынская Т.А., Поручиков П.В., Ордынский В.Ф. *Волновая терапия*. М.: Эксмо, 2008 [Ordynskaya T.A., Poruchikov P.V., Ordynsky V.F. *Wave therapy*. М.: Eksmo, 2008 (In Russ.)].
5. Frohlich H. *Biological coherence and response to external stimuli*. Eds. Frohlich H. Springer-verlag, 1988, pp. 1-24.
6. Srobar F. Radiating Frohlich system as a model of cellular electromagnetism. *Electromagn. Biol. Med.*, 2015, vol. 34, no. 4, pp. 355-360.
7. Hinrikus H., Lass J., Karai D., Pilt K., Bachmann M. Microwave effect on diffusion: a possible mechanism for non-thermal effect. *Electromagn Biol Med.*, 2015, vol. 34, no. 4, pp. 327-333.
8. Geesink J.H., Meier D.K.F. Bio-Soliton Model that predicts Non-Thermal Electromagnetic Radiation Frequency Bands, that either Stabilize or Destabilize Life Conditions. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 2017, vol. 36, iss. 4, pp. 357-378.
9. Казаринов К.Д. Исследование мембранотропной активности ЭМИ в широком диапазоне длин волн. *Электронная техника. Сер. 1. СВЧ – техника*, 2018, вып. 2, № 537, с. 62-75 [Kazarinov K.D. Study of membranotropic activity of EMR in a wide range of wavelengths. *Electronic equipment. Ser. 1. Microwave technology*, 2018, iss. 2, no. 537, pp. 62-75 (In Russ.)].
10. Виноградова М.Б., Руденко О.В., Сухоруков А.В. *Теория волн*. М.: Наука, 1990, 432 с. [Vinogradova M.B., Rudenko O.V., Sukhorukov A.V. *Wave theory*. М.: Nauka, 1990, 432 p. (In Russ.)].
11. Гершуни Г.З., Жуховицкий Е.М. *Конвективная устойчивость несжимаемой жидкости*. М: Наука, 1972, 393 с. [Gershuni G.Z., Zhukhovitsky E.M. *Convective stability of an incompressible fluid*. М: Nauka, 1972, 393 p. (In Russ.)].
12. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Теоретическая физика. Т.6. Гидродинамика*. М: Наука, 1986, 736 с. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Theoretical physics. T.6. Hydrodynamics*. М: Nauka, 1986, 736 p. (In Russ.)].
13. Левич В.Г. *Физико-химическая гидродинамика*. М: Физматгиз, 1959, с. 378-388 [Levich V.G. *Physico-chemical hydrodynamics*. М: Fizmatgiz, 1959, p. 378-388 (In Russ.)].

## STUDY OF A PHYSICAL MODEL OF THE BIOLOGICAL EFFECT OF MICROWAVE RADIATION IN THE EHF RANGE AT THE CELLULAR LEVEL OF THE ORGANIZATION OF A BIO-OBJECT

Titov A.S.<sup>1,2</sup>, Polnikov I.G.<sup>1</sup>, Titov S.V.<sup>1</sup>, Kazarinov K.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics of RAS

Vvedensky Sq., 1, Fryazino, 141190, Russia

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology

Institutskiy side-St., 9, Moscow, 141701, Russia; e-mail: pashkin1212@yandex.ru

Received 10.08.2024

**Abstract.** In this report theoretical analysis of experimental data on the study of absorbing EHF-radiation in aquatic environments is presented. Macroscopic movements of water were described by a general system of hydrodynamic equations, including the Navier-Stokes equation, the heat transfer equation, and the continuity equation, in the Boussinesq approximation. Some known mechanisms of biological sensitivity to UHF radiation, proposed by specialists when studying this issue, are presented. Data from recently published scientific articles on recording cytosolic convection in animal cells using new precision fluorescent methods were also analyzed. Based on the obtained theoretical estimates and our own experimental results a hypothesis is proposed for correcting the movement of intracellular fluid using low-intensity microwave radiation. The purpose of this research is to contribute to the understanding of the physical and biological processes associated with HF radiation and its potential effects on biological systems. This study may be useful for further development of knowledge about the effects of high-frequency radiation on cellular processes and biological systems, and may also be useful for the development of new methods of treatment and therapy in medicine.

**Key words:** absorption of EHF-radiation by water, hydrodynamic instability, intracellular movement, precision fluorescent method.

## ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОИОНОВ НА РАЗДЕЛЕНИЕ ФАЗ ЖИДКОСТЬ-ЖИДКОСТЬ В СИСТЕМЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-ПИЛЛАР[5]АРЕН

Скворцова П.В.<sup>1</sup>, Пергат А.В.<sup>1,2</sup>, Хайрутдинов Б.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН  
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: skvpolina@gmail.com

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, РФ

Поступила в редакцию 10.08.2024

**Аннотация.** Безмембранные органеллы являются одной из форм регуляции пространственно-временной организации биохимических процессов в клетках. Они представляют собой жидкоподобные структуры, образованные путем разделения фаз жидкость-жидкость, и могут включать поливалентные биомолекулы, такие как белки, РНК и ДНК. Большую роль в образовании безмембранных органелл играют мультивалентные взаимодействия, в том числе электростатическое взаимодействие заряженных поливалентных макромолекул. В данной работе представлены системы, моделирующие безмембранные органеллы и включающие в себя олигонуклеотид ДНК в качестве полианиона и катионные производные пиллар[5]арена с двумя различными типами противоионов. Методом молекулярного моделирования показано, что при взаимодействии пиллар[5]арена с олигонуклеотидом могут быть образованы комплексы из нескольких молекул с различной стехиометрией, что может способствовать образованию супрамолекулярных ансамблей и разделению фаз жидкость-жидкость. Методом ЯМР-спектроскопии показано, что изменение противоиона пиллар[5]арена оказывает влияние на интенсивность разделения фаз жидкость-жидкость, стехиометрию молекул в конденсированной жидкой фазе и «эффективность» конденсации ДНК. В системе, содержащей пиллар[5]арен с противоионом йода разделение фаз жидкость-жидкость происходит интенсивнее, чем в системе включающей пиллар[5]арен с противоионом хлора.

**Ключевые слова:** пиллар[5]арен, ДНК, разделение фаз жидкость-жидкость.

### ВВЕДЕНИЕ

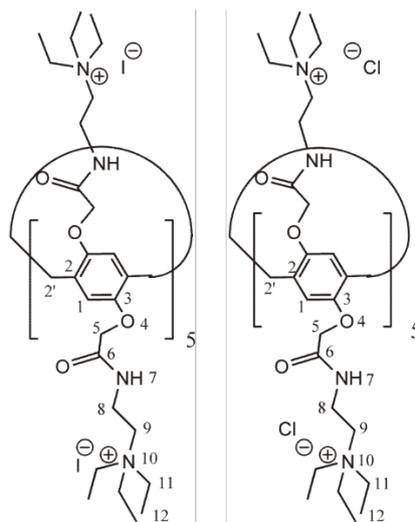
Пространственно-временная организация биохимических процессов в клетках обеспечивается за счет органелл. Органеллы представляют собой отсеки внутри клетки и имеют границы, отделяющие среду с уникальными свойствами внутри от внешнего пространства. Клетки содержат как мембранные, так и безмембранные органеллы. Мембранные органеллы отделены от цитоплазмы мембраной, которая является физической границей органеллы. Безмембранные органеллы обладают жидкоподобными свойствами и образуются в процессе разделения фаз жидкость-жидкость [1]. Они могут включать в себя широкий спектр поливалентных биомолекул, таких как белки, ДНК и РНК [2].

Изучение реальных систем безмембранных органелл, встречающихся в живых клетках, осложняется их многокомпонентным составом и сложностью приготовления. Использование модельных систем может оказаться полезным для определения физико-химических принципов их формирования. В нашей работе мы исследовали систему, содержащую поликатионные производные пиллар[5]арена и полианионный олигонуклеотид. Ранее нами было показано, что данная система способна к фазовому разделению жидкость-жидкость и может служить прототипом безмембранной органеллы [3].

Согласно литературным данным важную роль в фазовом разделении играют мультивалентные взаимодействия. В случае электростатического мультивалентного взаимодействия эффективность фазового разделения можно варьировать за счет изменения противоионов взаимодействующих макромолекул. В качестве следующего шага для изучения полученной нами системы был синтезирован пиллар[5]арен с двумя различными типами противоионов – хлора и йода.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны полианионный декамер ДНК и поликатионные производные пиллар[5]арена, синтезированные согласно опубликованной ранее процедуре [4]. Структурные формулы 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-дека-[(N-(2',2',2'-триэтиламиноэтил)-карбамоилметокси]-пиллар[5]арена с противоионами йода и хлора представлены на рисунке 1.



Пиллар[5]арен- $I^-$       Пиллар[5]арен- $Cl^-$

**Рисунок 1.** Структурные формулы исследованных производных пиллар[5]арена

Эксперименты ЯМР проводились на базе центра коллективного пользования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН в Казанском Институте Биохимии и Биофизики в лаборатории Биофизической Химии Наносистем. Все спектры ЯМР были получены на спектрометре Bruker Avance III 600, оснащенный тройным резонансным датчиком ТХ1 ( $^1H$ ,  $^{13}C$  и  $^{15}N$ ), градиентной катушкой и блоком контроля температуры VCU05. Эксперименты по диффузии ЯМР  $^1H$  проводили со стандартным датчиком высокого разрешения с обратным тройным резонансом по оси z (ТХ1, 5 мм) с максимальным градиентом магнитного поля 0,55 Тл/см. Коэффициенты самодиффузии измеряли с использованием стандартной последовательности импульсов «стимулированное эхо» с биполярными градиентными импульсами `stebpgpl19` из библиотеки импульсных последовательностей Bruker для ЯМР-спектрометра. Амплитуда градиента поля варьировалась от 5 до 95 % от его максимального значения за 16 приращений при постоянном времени диффузии ( $\Delta=50$  мс) и разных длительностях градиентного импульса ( $\delta=4,9\div 7,0$  мс). Для калибровки химических сдвигов использовали коаксиальную вставку в ампулы для образцов ЯМР, содержащую  $D_2O$  и TSP (натриевой соли (3-(триметилсилил)-2,20,3,30-тетрадейтеропропионовой кислоты)). Все спектры были записаны при 30°C и откалиброваны по пику TSP в коаксиальной вставке.

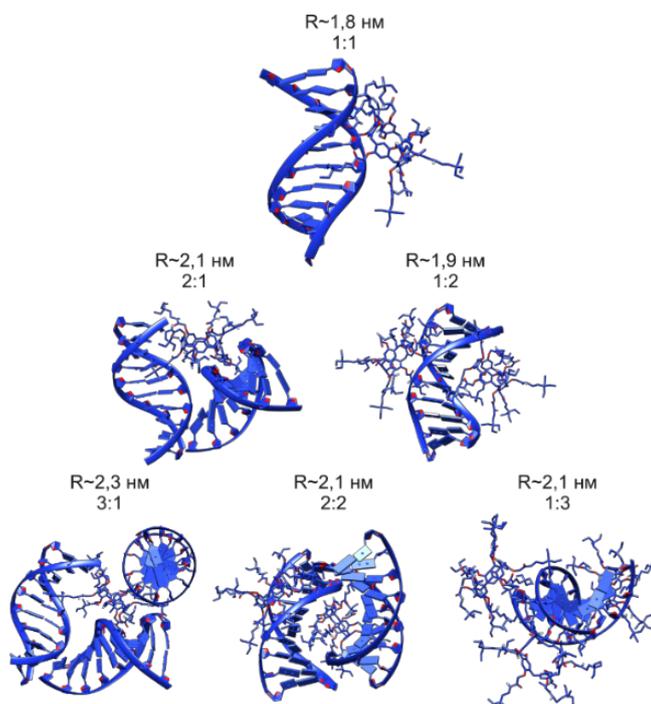
Структура ЯМР олигонуклеотида (код в PDB 1CQO) [5] использовалась для моделирования комплексов. Для моделирования комплексов со стехиометрией, отличной от 1:1, в качестве лиганда выступали молекулы пиллар[5]арена или олигонуклеотида, в качестве макромолекулы комплексы, полученные ранее.

Моделирование молекулярного докинга проводили с помощью AutoDock 4.3 (AutoDock) [6]. Слепой докинг проводили с использованием ламарковского генетического алгоритма (LGA) [7]. Карта стыковочной сетки с размером 126x126x126 точек и шагом сетки 0,375 Å была центрирована на ONu с помощью программы AutoGrid [8]. Расчет модели комплекса (стыковки) состоял из 100 независимых прогонов с максимальным количеством оценок энергии 2500000.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки стехиометрии комплексов в растворе нами были проведены измерения коэффициента самодиффузии (КСД) молекул методом ЯМР диффузографии и определен гидродинамический радиус комплекса олигонуклеотид-пиллар[5]арен, который составил  $2.0\pm 0.2$  нм [3]. В тоже время, комплекс олигонуклеотида с пиллар[5]ареном 1:1, полученный методом молекулярного докинга характеризуется радиусом 1,8 нм [3]. Однако, как было показано ранее, в образовании такого комплекса задействованы 4-5 заряженных групп пиллар[5]арена из 10. Следовательно, свободные 5-6 групп пиллар[5]арена могут взаимодействовать с другой молекулой олигонуклеотида. Соответственно, при образовании комплекса 1:1 у молекулы олигонуклеотида также остаются нескомпенсированные заряды. Это может способствовать образованию более протяженных супрамолекулярных ансамблей и приводить к разделению фаз жидкость-жидкость [3].

Для проверки способности компонент системы образовывать комплексы со стехиометрией, отличной от 1:1 и оценки их гидродинамических радиусов были смоделированы комплексы пиллар[5]арен/олигонуклеотид, включающие различное число молекул. Примеры стабильных комплексов с различной стехиометрией, полученных в ходе компьютерных экспериментов представлены на рисунке 2.

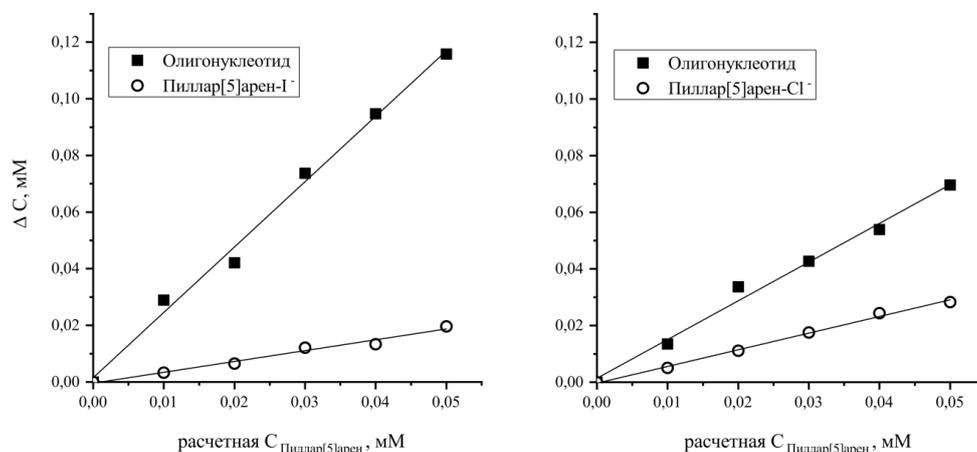


**Рисунок 2.** Модели комплексов олигонуклеотид-пиллар[5]арен с различной стехиометрией

Как видно из рисунка 2, в диапазон радиусов  $2 \pm 0,2$  нм кроме комплексов со стехиометрией олигонуклеотид:пиллар[5]арен 1:1 входят также комплексы со стехиометриями 2:1, 1:2, 2:2 и 1:3. Так как наблюдаемое значение КСД представляет собой средневзвешенное значение КСД молекул во всех состояниях, то вероятно образование комплексов более чем из двух молекул с различными стехиометриями. Такое поведение может способствовать образованию и более протяженных супрамолекулярных структур.

Кроме того, при увеличении концентрации пиллар[5]арена наблюдалось уменьшение интегральной интенсивности сигналов олигонуклеотида в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$ . Это может объясняться участием части молекул олигонуклеотида в образовании крупных молекулярных ассоциатов. В этом случае молекулы, участвующие в формировании больших супрамолекулярных ансамблей, не будут давать вклада в интегральную интенсивность сигнала. Тогда интегральная интенсивность сигнала ЯМР будет пропорциональна концентрации молекул, не участвующих в надмолекулярной ассоциации.

Спектроскопию ЯМР использовали для определения стехиометрии молекул в конденсированной фазе и оценки «эффективности» конденсации. Изменение концентрации олигонуклеотида (относительно исходной концентрации) и концентрации пиллар[5]арена (относительно ожидаемой концентрации) наблюдали в водном растворе с помощью ЯМР  $^1\text{H}$ . К раствору олигонуклеотида добавляли аликвоты исходных растворов пиллар[5]арена для получения смесей с различным соотношением зарядов  $\text{N}^+/\text{P}^-$ . Концентрацию растворенных молекул в ампуле ЯМР контролировали, измеряя интегральную интенсивность сигналов протонов в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  (рис. 3).



**Рисунок 3.** Изменение концентрации молекул олигонуклеотида (относительно начальной концентрации – черные квадраты) и пиллар[5]арена (относительно титрования воды – белые круги). Слева – пиллар[5]арен-I<sup>-</sup>, справа – пиллар[5]арен-Cl<sup>-</sup>

**Таблица 1.** Наклоны прямых, описывающих изменение концентрации молекул в растворе в зависимости от добавляемого количества пиллар[5]арена

	Пиллар[5]арен-Г <sup>-</sup>	Пиллар[5]арен-СГ <sup>-</sup>
$\Delta C_{\text{Олигонуклеотид}}/C_{\text{Пиллар[5]арен}}$	2,31±0,09	1,37±0,07
$\Delta C_{\text{Пиллар[5]арен}}/C_{\text{Пиллар[5]арен}}$	0,38±0,03	0,59±0,02
$C_{\text{Олигонуклеотид}}/C_{\text{Пиллар[5]арен}}$ в конденсированной фазе	6	2,3
доля сконденсированного олигонуклеотида	58%	35%

Как видно из рисунка, увеличение концентрации пиллар[5]арена в растворе приводит к изменению наблюдаемой концентрации олигонуклеотида, регистрируемой методом ЯМР-спектроскопии, на 120 мкМ (от 200 мкМ до 80 мкМ) в случае пиллар[5]арен декайодида, и на 70 мкМ (от 200 мкМ до 130 мкМ) в случае декахлорида. Концентрация пиллар[5]арена в растворе также отличается от расчетной. Следовательно, образующаяся жидкая фаза содержит как молекулы олигонуклеотида, так и молекулы пиллар[5]арена. Из рисунка видно, что изменение концентраций всех молекул происходит линейно. Это свидетельствует о том, что в водных растворах стехиометрия молекул в конденсированной фазе остается постоянной при увеличении концентрации пиллар[5]арена. Сравнивая наклоны этих прямых, можно сделать выводы об «эффективности» конденсации и соотношении молекул олигонуклеотида и пиллар[5]арена в конденсированной фазе (таблица 1). На одну молекулу пиллар[5]арена-Г<sup>-</sup> приходится шесть молекул олигонуклеотида, ~60% ДНК переходит в конденсированную фазу (при достижении максимума исследованных концентраций пиллар[5]арена). На одну молекулу пиллар[5]арена-СГ<sup>-</sup> приходится 2,3 молекулы олигонуклеотида, а ~35% ДНК переходит в конденсированную фазу. Таким образом, пиллар[5]арен с противоионом йода конденсирует ДНК более «эффективно».

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-23-00632. [https://rscf.ru/prjcard\\_int?23-23-00632](https://rscf.ru/prjcard_int?23-23-00632).

#### Список литературы / References:

- Berry J., Weber S.C., Vaidya N., Haataja M., Brangwynne C.P. RNA transcription modulates phase transition-driven nuclear body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2015, 112, DOI: 10.1073/pnas.1509317112
- Li P., Banjade S., Cheng H.-C., Kim S., Chen B., Guo L., Llaguno M., Hollingsworth, J.V., King, D.S., Banani, S.F., Russo, P.S., Jiang, Q.-X., Nixon, B.T., Rosen, M.K. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 2012, vol. 483, DOI: 10.1038/nature10879
- Skvortsova P., Shurpik D., Stoikov I., Khairutdinov B. Pillar[5]arene-induced DNA condensation: Liquid–liquid phase separation in pillar[5]arene-oligonucleotide system. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 368, 120683, DOI: 10.1016/j.molliq.2022.120683
- Shurpik D.N., Yakimova L. S., Rizvanov I. Kh., Plemenkov V. V., Stoikov I. I. Water-Soluble Pillar[5]arenes: Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes with p-Toluenesulfonic Acid. *MHC*, 2015. vol. 8, no 2, pp. 128–134, DOI: 10.6060/mhc140928s
- Berman H.M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no 1. pp. 235–242, DOI: 10.1093/nar/28.1.235
- Morris G.M. Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 2009. vol. 30, no 16. pp. 2785–2791, DOI: 10.1002/jcc.21256
- Morris G.M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 1998, vol. 19, no 14. pp. 1639–1662, DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B
- Sanner M.F. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 1999, vol. 17, no 1. pp. 57–61

## EFFECT OF COUNTERIONS ON LIQUID-LIQUID PHASE SEPARATION IN THE OLIGONUCLEOTIDE-PILLAR[5]ARENE SYSTEM

Skvortsova P.V.<sup>1</sup>, Pergat A. V.<sup>1,2</sup>, Khairutdinov B.I.<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS  
*Lobachevsky St., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: skvpolina@gmail.com*<sup>2</sup> Kazan Federal University  
*Kremlevskaya St., 18, Kazan, 420008, Russia*

Received 10.08.2024

**Abstract.** Membraneless organelles are one of the biochemical processes in cells spatiotemporal organization regulaton forms. They are liquid-like structures formed by liquid-liquid phase separation and can include polyvalent biomolecules such as proteins, RNA, and DNA. Multivalent interactions, including electrostatic interaction of charged polyvalent macromolecules, play an important role in the formation of membraneless organelles. This paper presents systems simulating membraneless organelles and including a DNA oligonucleotide as a polyanion and cationic derivatives of pillar[5]arene with two different types of counterions. It is shown that complexes of several molecules with different stoichiometry can be formed during the interaction of pillar[5]arene with oligonucleotide using molecular modeling, which can facilitate the formation of supramolecular assemblies and liquid-liquid phase separation. NMR spectroscopy has shown that changes in the pillar[5]arene counterion affect the intensity of liquid-liquid phase separation, the stoichiometry of molecules in the condensed liquid phase, and the "efficiency" of DNA condensation. In a system containing pillar[5]arene with an iodine counterion, liquid-liquid phase separation occurs more intensely than in a system including pillar[5]arene with a chlorine counterion.

**Key words:** *pillar[5]arene, DNA, liquid-liquid phase separation.*

## ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ЛЬНА В ЦЕЛЛЮЛОЗУ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ЕГО ПРЕДПОСЕВНОЙ СТИМУЛИРУЮЩЕЙ ОБРАБОТКИ

Будник М.И.<sup>1</sup>, Апашева Л.М.<sup>2</sup>, Барнашова Е.К.<sup>3</sup>, Ведутенко В.В.<sup>2</sup>, Вертикова Е.А.<sup>3</sup>, Грудзинский А.В.<sup>1</sup>, Касаикина О.Т.<sup>2</sup>, Круговов Д.А.<sup>2</sup>, Овчаренко Е.Н.<sup>2</sup>, Пролетова Н.В.<sup>4</sup>, Ростовцев Р.А.<sup>4</sup>, Савранский В.В.<sup>5</sup>, Симагин А.Д.<sup>3</sup>, Смурова Л.А.<sup>2</sup>, Тараскин К.А.<sup>6</sup>, Уцаповский И.В.<sup>4</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> Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ

<sup>3</sup> Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева

ул. Тимирязевская, 49, г. Москва, 127434, РФ

<sup>4</sup> Федеральный научный центр лубяных культур

просп. Комсомольский, 17/56, г. Тверь, 170041, РФ

<sup>5</sup> Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН»

ул. Вавилова, 38, г. Москва, 119991, РФ

<sup>6</sup> Научно-исследовательский институт прикладной акустики

ул. 9 Мая, 7А, г. Дубна, 141981, РФ

Поступила в редакцию 10.08.2024

**Аннотация.** Предложен способ предпосевной обработки семян льна для стимулирования роста, развития и повышения стрессовой устойчивости растений, основанный на обработке двухчастотным лазерным импульсным излучением, получаемым на парах меди, обладающим следующими выходными характеристиками: длины волн 510,6 нм (зеленая линия излучения) и 578,2 нм (желтая линия излучения), длительность импульса 15 нс, частота повторения 10 кГц, суммарная мощность в импульсе 10 кВт, соотношение энергии и мощности между зеленой и желтой линиями излучения 3:1. Взаимодействие в нелинейной среде семени лазерного излучения с длинами волн 510,6 и 578,2 нм вызывало образование дополнительных длин волн: суммарной с длиной волны 271 нм (ультрафиолетовое излучение) и разностной – 4,37 мкм. Тестировали эффект облучения семян в течение трех этапов развития растений. Опытные показатели тестирования превышали контрольные значения. Сопоставляли способы извлечения целлюлозы из льна: экологическая модификация традиционного способа варки растительного сырья с растворами гидроксида и бисульфита натрия с последующим отбеливанием пероксидом водорода и безотходный окислительно-каталитический способ освобождения целлюлозы от лигнина, гемицеллюлозы и других компонентов с использованием гетерогенного катализатора на основе оксидов железа (III) и пероксида водорода. Качество получаемой целлюлозы зависит от соотношения количества реагентов (биомасса, катализатор, пероксид водорода) и времени обработки. Жидкую фракцию продуктов окислительного крекинга сырья – это водный раствор низкомолекулярных продуктов, возможно использовать как стимулятор роста растений.

**Ключевые слова:** лен, лазер на парах меди, целлюлоза, окислительно-каталитический способ, гетерогенный катализатор, крекинг.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время особенно актуальным является совершенствование биотехнологических приемов культивирования растений, выращенных с целью получения определенного востребованного продукта, и создание инновационных методов их переработки. К таким необходимым в современных условиях сельскохозяйственным культурам, имеющим многофункциональное значение и применение, относится лен – исконно русская продовольственная и техническая культура. Все части растения могут быть использованы в различных отраслях народного хозяйства. Семена льна богаты протеинами, жирами, клетчаткой, содержат ароматические кислоты, сахара. Состав семени и растительной надземной части льна может меняться в зависимости от сорта и способа выращивания. В последнее время лен-долгунец все более востребован в качестве технической культуры как сырьевой источник получения целлюлозы в интересах пороховой промышленности и специальной химии взамен импортного хлопка [1].

Одним из перспективных сортов льна для получения целлюлозы специального назначения может являться лен-долгунец сорта Цезарь.

#### Цели работы:

1. Разработка экологически чистого способа переработки отечественного льна для получения целлюлозы определенного качества.

2. Совершенствование биотехнологических приемов предпосевной обработки семян льна с помощью лазерного излучения для стимуляции роста, развития и повышения стрессовой устойчивости перспективных сортов льна.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для стимуляции роста, развития и повышения стрессовой устойчивости льна-долгунца перспективного сорта Цезарь, а также исключения слипания, которое имеет место после предпосевной обработки стандартными растворами химиопрепаратов, сухие семена обрабатывали излучением импульсного лазера на парах меди, генерирующего одновременно свет двух длин волн: зеленой 510,6 нм и желтой 578,2 нм с суммарной мощностью в импульсе 10 кВт, частотой повторения 10 кГц и длительностью импульса 15 нс, при этом соотношение энергии и мощности между зеленой и желтой линиями излучения составляло 3:1 [2].

Облучение семян проводили в течение 10, 20, 40 с.

Облученные и контрольные семена раскладывали в чашки Петри на увлажненные водой фильтры и помещали в термостат при температуре +20°C. Начало прорастания определяли по количеству наклонувшихся семян через двое суток после обработки. На третьи сутки вели учет семян с длиной корня  $\geq 2$  мм. Далее проросшие контрольные и опытные семена высаживали в специальные культуральные сосуды, создавали стрессовые условия культивирования (обедненный грунт – песок при минимальном однократном увлажнении водой; песок – 150 мл, вода – 90 мл). Сосуды выставляли в люминостат с условиями: освещенность 130 люкс, чередование свет:темнота = 12:12 ч. Учет качества растений, степень развития (количество растений, имеющих свободный зеленый лист) облученных и контрольных семян вели на 7 сутки подращивания в культуральных сосудах, на 11 сутки учитывали количество растений, выживших в стрессовых условиях культивирования.

Одним из первых тестов, по которому возможно определение начала процесса пробуждения семян, является фиксация выхода метаболитов из семян при замачивании их в воде, что свидетельствует о начале активации семян. Семена помещали в специальные кварцевые кюветы с длиной оптического пути  $L = 1$  см: 10 семян заливали 3 мл дистиллированной воды. Пробы воды для измерения в контроле и опыте отбирали через определенное время. Определяли кинетические кривые выхода метаболитов в водную среду в течение 100 минут. Спектр поглощения метаболитов записывали на спектрофотометре Specord UV-VIS в ультрафиолетовой области при  $\lambda_{\max} = 210$  нм при температуре +19-20°C. В кювете сравнения была бидистиллированная вода.

Экологическую модификацию традиционного способа получения целлюлозы с использованием растворов гидроксида и бисульфита натрия испытывали на примере биомассы льна-долгунца обыкновенного – *Linum usitatissimum* L. Стебли измельчали до фрагментов длиной  $\leq 3$  см, сушили и подвергали дроблению на лабораторной мельнице. Химическую обработку полученного биоматериала раствором гидроксида натрия (10%) и пероксида водорода (10%) проводили на лабораторной установке из стекла, состоящей из термостатируемого реактора, обеспеченного перемешивающим устройством, обратным холодильником и устройством для отбора проб при температуре +95±0,4°C в течение 2 часов, после чего растворитель удаляли на фарфоровом фильтре под воздействием вакуума, а остаток промывали деионизированной водой до полного осветления отходящего раствора. Твёрдый остаток осушали в термошкафе при температуре +55-60°C. Для получения очищенной целлюлозы, пригодной для выпуска бумаги высокого качества и ряда других товаров, применили вторую ступень обработки полученного твердого продукта – дополнительную обработку водным раствором пероксида водорода (10%) и уксусной кислоты (12,5%) при +90°C в течение 2 ч.

Практически безотходный окислительно-каталитический способ выделения целлюлозы испытывали на примере обработки льна в соответствии с ГОСТом Р 53484-2022 с использованием длинного трепаного ориентированного льняного волокна, получаемого в результате обработки льняной тресты. Коллоидный катализатор получали путем гидролиза хлорида железа (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Merck KGaA, Германия) в воде. Образующуюся в результате гидролиза соляную кислоту нейтрализовали путем добавления карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , х. ч.) до  $\text{pH} \geq 6$ . В качестве основного окислителя применяли 30%-ный раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ч. д. а. ООО «АО

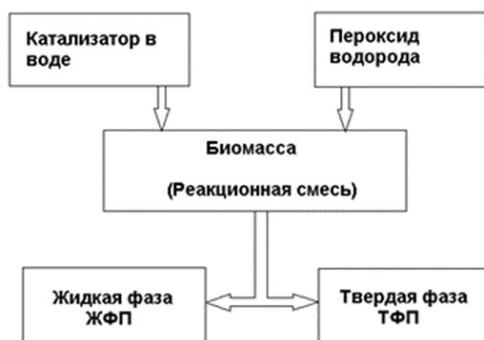


Рисунок 1. Принципиальная схема каталитической окислительной переработки биомассы (ЖФП – жидкофазный продукт, ТФП – твердофазный продукт)

Реахим»). На рисунке 1 схематически представлен процесс каталитической окислительной переработки биомассы, который осуществлялся в одну стадию в мягких условиях (+60-70°C) в водном растворе при атмосферном давлении.

В реактор (термостатированный сосуд, снабженный мешалкой, обратным холодильником и устройством для отбора проб) загружали измельченную биомассу, добавляли коллоидный раствор катализатора в необходимом количестве воды, после перемешивания и адсорбции катализатора на поверхности биомассы, добавляли необходимое количество  $H_2O_2$  [3,4] (соотношение биоматериал-вода 1:50). По ходу реакции отбирали пробы, в которых определяли концентрацию  $H_2O_2$  (йодометрическим методом) и образующихся кислот (титрованием спиртовым раствором КОН). Кроме того, используя качественные реакции с тиоцианатом калия, желтой и красной кровяной солью, контролировали переход в водную фазу ионов Fe(III) и Fe(II) соответственно. После израсходования  $H_2O_2$  твердый продукт отделяли от жидкой фазы фильтрованием и промывали дистиллированной водой, затем сушили до постоянного веса.

Содержание функциональных групп в целлюлозе до и после обработки качественно контролировали по инфракрасным спектрам с помощью метода многократного полного внутреннего отражения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

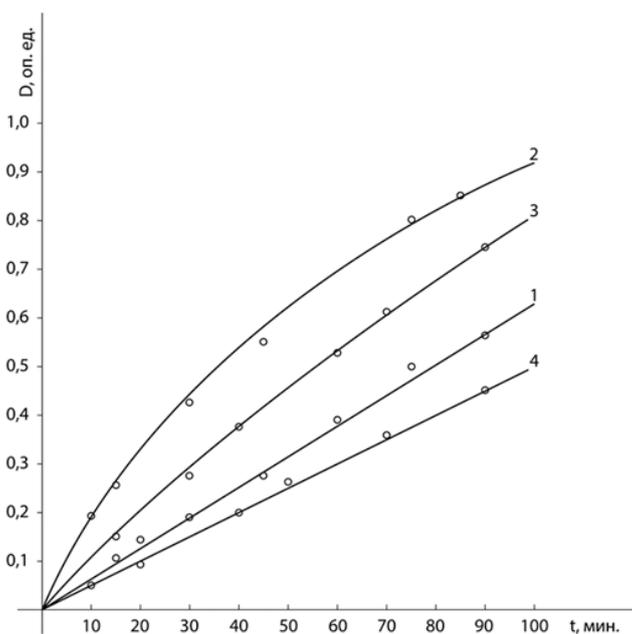
Тестирование эффекта действия двухчастотного импульсного лазерного облучения на семена льна сорт Цезарь вели на протяжении трех этапов развития растений.

I этап. Это первые часы после облучения – фиксация пробуждения семян по учету выходящих метаболитов из семян.

Смеси метаболитов имеют характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области. Первым показателем начала пробуждения семян является выход в водную среду смеси метаболитов, имеющих характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области с четко выраженным максимумом поглощения на длине волны  $\lambda = 210$  нм. Вид спектра не меняется по ходу процесса замачивания, что свидетельствует о том, что определенный состав продуктов, выходящих в водную среду замоченных семян, остается постоянным в течение длительного времени.

Выход метаболитов из семян, регистрируемый по спектрам поглощения, наблюдали сразу после замачивания семян, когда морфологические изменения прорастания семян еще не проявляются. Предполагается, что вещества, выделяющиеся в водную среду, представляют собой продукты катаболизма, такие как аминокислоты, витамины, кофакторы и другие соединения, содержащие ароматические и гетероциклические фрагменты.

Измеряемая величина оптической плотности (D) в максимуме поглощения при  $\lambda = 210$  нм в контроле и опытах может рассматриваться как показатель интенсивности пробуждения семян в водной среде (выход метаболитов) на самых ранних стадиях их активации.



**Рисунок 2.** Кинетические кривые выхода метаболитов во времени из семян льна сорта Цезарь при их замачивании после двухчастотного импульсного лазерного облучения в опытных группах и без облучения в контрольной группе: кривая 1 – контрольная группа без облучения; кривая 2 – облучение 10 с; кривая 3 – облучение 20 с; кривая 4 – облучении 40 с

На рисунке 2 представлены кинетические кривые выхода метаболитов из семян льна-долгунца сорта Цезарь в воду в контрольной и опытных группах. Выход метаболитов в водную среду наблюдался практически сразу, однако наибольшая скорость их выхода была характерна для опытных кривых 2 и 3, то есть после облучения 10 и 20 с, а минимальная скорость выхода метаболитов (ниже контрольных значений – кривая 1) наблюдалась при облучении 40 с (кривая 4). Следовательно, по данным выхода метаболитов процесс пробуждения семян происходит максимально интенсивно при облучении 10-20 с и без эффекта стимуляции при облучении 40 с, что коррелирует с результатами, наблюдаемыми на втором и третьем этапах развития растений.

II этап: 2-3 сутки после облучения – фиксация начала проклевывания и прорастания семян на увлажненных фильтрах в термостате.

Начало пробуждения семян (наклёвывание) отмечено уже на 2 сутки эксперимента. На 3 сутки учитывали количество проросших семян. Проросшими считали семена с длиной корня  $\geq 2$  мм. Определена зависимость эффекта облучения от времени воздействия. Стимуляция прорастания семян отмечалась при облучении их в течение 10 и 20 с. Проросших семян в контроле было не более 50%. При облучении в течение 10 и 20 с проросших семян было соответственно 80% и 60%. При облучении в течение 40 с проросших семян определено не более 40%.

III этап – оценка развития льна на 7 и 11 сутки роста растений при выращивании их в культуральных сосудах в стрессовых условиях на песке в люминостате.

На 7 сутки роста растений в культуральных сосудах учитывали степень развития растений по наличию свободного зеленого листа. Количество растений, имеющих свободный зеленый лист: в контроле (без облучения) определено 40%, при облучении в течение 10, 20, 40 с – 70%, 60%, 30% соответственно. К 11 суткам определяли количество растений, выживших в стрессовых условиях культивирования. В контроле осталось 10% живых растений, при облучении в течение 10, 20 и 40 с – соответственно 30%, 20% и 5% выживших растений.

В результате использования экологической модификации традиционного получения целлюлозы после обработки подготовленного измельченного биосырья на первой стадии водным раствором гидроксида натрия (10%) в присутствии пероксида водорода (10%) в течение 2 ч при  $+95^{\circ}\text{C}$  была получена техническая целлюлоза, содержащая 77,4% целлюлозы, 7,8% лигнина, 5% влаги и 9,8% иных примесей. После применения второй ступени обработки технического продукта водным раствором пероксида водорода (10%) и уксусной кислоты (12,5%) при  $+90^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч был получен образец, содержащий следующий состав компонентов, % масс.: целлюлоза – 84,2; лигнин – 3,6; влага – 5,4; прочие примеси – 6,8. Таким образом, двухступенчатая обработка льняного биоматериала, проведённая с применением экологически приемлемых ингредиентов, обеспечивает получение образцов, имеющих в составе высокое содержание целлюлозы и незначительное количество сопутствующих примесей [5].

В каталитическом окислительном методе важным моментом является коллоидно-гетерогенный характер катализатора, который сорбируется на поверхности биоматериала и локально генерирует радикалы из пероксида водорода и окисляет с поверхности лигнин, гемицеллюлозу и иные компоненты биомассы, переводя их в жидкую фазу. В результате каталитической окислительной деструкции получается твёрдофазный продукт (ТФП) и жидкофазный продукт (ЖФП) – жидкая смесь водорастворимых продуктов окисления. В зависимости от массового отношения биомасса/пероксид водорода/катализатор ТФП представляет собой чистую микрокристаллическую целлюлозу, которая является пищевой добавкой E460 и находит применение в фармацевтической и пищевой промышленности, или целлюлозу с остатками лигнина, которую можно использовать как компонент строительных материалов (шпатлевки, цементы, полимерные композиты). ЖФП представляет собой смесь биологически активных веществ (концентрат), потенциально пригодных для приготовления пищевых и кормовых добавок, консервантов для животноводства и для использования в фармакологии (смесь органических кислот, олигосахаридов, простых и сложных эфиров, образовавшихся в результате окисления гемицеллюлозы, лигнина и других компонентов биомассы). В целом каталитический окислительный метод открывает возможности разработки практически безотходной технологии переработки льняного сырья.

Как показали настоящие экспериментальные исследования, а также многолетняя практика применения лазерных технологий в растениеводстве [6,7], действительно, одной из альтернатив химической стимуляции семян является экологически чистое воздействие лазерным слабым излучением, которое имеет целый ряд преимуществ перед существующими химическими способами предпосевной обработки семян, а именно:

- кратковременность воздействия и отсутствие отрицательных эффектов в широком диапазоне режимов лазерного воздействия;
- стабильное повышение урожайности сельскохозяйственных культур на фоне различных почвенно-климатических условий;
- повышение качества сельскохозяйственной продукции (увеличение сахаров, витаминов, содержание белка и клейковины);
- возможность снижения нормы высева на 10-30% за счет повышения полевой всхожести семян и усиления ростовых процессов;
- повышение устойчивости растений к поражению различными заболеваниями;
- безвредность обработки для семян и обслуживающего персонала.

Для предпосевной обработки семян обычно используют непрерывное монохроматическое излучение, получаемое с помощью газового гелий-неонового или полупроводникового лазеров. Применение для

предпосевной обработки семян, в частности семян льна, двухчастотного лазерного импульсного излучения, получаемого на парах меди, является инновационным биотехнологическим приемом.

Взаимодействие в нелинейной среде семени лазерного излучения с длинами волн 510,6 и 578,2 нм вызывало образование дополнительных длин волн: суммарной с длиной волны 271 нм (ультрафиолетовое излучение) и разностной – 4,37 мкм. Воздействие каждой из четырех длин волн в своем спектральном диапазоне могло приводить к инициации, по меньшей мере, четырех, вызванных излучением, биохимических реакций. Выбор импульсного режима работы лазера обеспечивал высокую эффективность воздействия, так как к постоянному уровню воздействия биосистемы быстро адаптируются. Интенсивное пробуждение семян в водной среде (выход метаболитов) происходило уже на самых ранних стадиях их активации, что позволило ускорить процесс прорастания семян и повысить процент всхожести семян, увеличивало их жизнеспособность и функциональную активность, что приводило к повышению устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды.

Одним из механизмов стимулирующего действия двухчастотного лазерного импульсного излучения, получаемого на парах меди, может являться ультрафиолетовое излучение, под воздействием которого, как известно, может образовываться пероксид водорода [8], являющийся стимулятором роста и развития растений, например, зерновых культур [9].

Таким образом, предпосевная обработка семян льна двухчастотным лазерным импульсным излучением, получаемым на парах меди, в течение 10-20 с оказывает стимулирующее влияние на рост и развитие льна на ранних стадиях развития, при этом также повышается его устойчивость при выращивании в стрессовых условиях среды. Использование лазерной обработки семян позволяет избежать слипания семян льна, неизбежного при предпосевной обработке стандартными растворами химиопрепаратов.

Окислительно-каталитический способ переработки льняного сырья открывает новые возможности разработки достаточно гибкой экологически безопасной технологии, при этом жидкую фракцию продуктов окислительного крекинга сырья возможно использовать как стимулятор роста растений.

#### Список литературы / References:

1. *Лён в пороховой промышленности*. 3-е изд., доп. и перераб. Под ред. И.Н. Торгуна. М.: ЦНИИХМ, 2021, 392 с. [*Lyen v porokhovoј promyshlennosti*. 3-е izd., dop. I pererab. Pod red. I.N. Torguna. M.: TSNIKHМ, 2021, 392 p. (In Russ.)].
2. Апашева Л.М., Смурова Л.А., Касаикина О.Т., Лобанов А.В., Овчаренко Е.Н., Борулева Е.А., Савранский В.В. *Способ повышения всхожести семян и стрессоустойчивости сеянцев хвойных пород*. Патент РФ № 2790449, 2023 [Lobanov A.V., [Apasheva L.M., Smurova L.A., Kasaikina O.T., Lobanov A.V., Ovcharenko E.N., Boruleva E.A., Savranskiy V.V. *Sposob povisheniya vskhozhesti semyan i stressoustojchivosti seyantsev khvojnikh porod*. Patent RF № 2790449, 2023 (In Russ.)].
3. Писаренко Л.М., Лесин В.И., Касаикина О.Т. Окислительная переработка биомассы с использованием катализаторов на основе оксидов железа (III). *Изв. АН. Сер. хим.*, 2014, № 3, с. 688-692 [Pisarenko L.M., Lesin V.I., Kasaikina O.T. Okislitel'naya pererabotka biomassi s ispolzovaniem katalizatorov na osnove oksidov zheleza (III). *Izv. AN. Ser. khim*, 2014, no. 3, pp. 688-692 (In Russ.)].
4. Писаренко Л.М., Касаикина О.Т., Иванов В.Б. Распад пероксида водорода, катализированный, нанесенным на целлюлозу, гидроксидом железа. *Химическая физика*, 2020, т. 39, № 9, с. 773-780 [Pisarenko L.M., Kasaikina O.T., Ivanov V.B. Raspad peroksida vodoroda, katalizirovannij, nanesenym na thelyulozu, gidroksidom zheleza. *Khimicheskaya fizika*, 2020, vol. 39, no. 9, pp. 773-780, doi: 10.31857/S0207401X20090095 (In Russ.)].
5. Сергеев С.Н., Тараскин К.А., Орлов Д.С., Барнашова Е.К., Вертикова Е.А., Будник М.И., Касаикина О.Т., Ведутенко В.В., Круговов Д.А., Ростовцев Р.А., Ущачовский И.В., Пролетова Н.В. Выбор экологически безопасного метода получения целлюлозы из биомассы льна (*linum usitatissimum linaceae*), выращенного в различных регионах Поволжья. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*, 2024, № 5 (сентябрь-октябрь), принята к публикации. [Sergeev S.N., Taraskin K.A., Orlov D.S., Barnashova E.K., Vertikova E.A., Budnik M.I., Kasaikina O.T., Vedutenko V.V., Krugovov D.A., Rostovtsev R.A., Ushchapovskiy I.V., Proletova N.V. Viber ekologicheskii bezopasnogo metoda polucheniay tselulozy iz biomassy lina (*linum usitatissimum linaceae*), vyrashchennogo v pazlichnikh regionakh Povolzhay. *Vestnik rossijskoј selskokhozayajstvennoј nauki*, 2024, no. 5, (sentyabr-oktyabr), prinita k publikatsii. (In Russ.)].
6. Инюшин В.М., Ильясов Г.У., Федорова Н.Н. *Луч лазера и урожай*. Алма-Ата: Кайнар, 1981, 188 с. [Inyushin V.M., Ilyasov G.U., Fedorov N.N. *Luch lazera i urozhay*. Alma-Ata: Kaynar, 1981, 188 p. (In Russ.)].
7. Буклагин Д.С., Голубев И.К., Мишуров Н.П. *Применение лазерных технологий в сельском хозяйстве и перерабатывающей промышленности: аналитический обзор*. М.: Росинформагротех, 2020, 60 с. [Buklagin D.S., Golubev I.K., Mishurov N.P. *Primenenie lazernykh tekhnologiy v selskom khozayjstve i pererabativayushchey promyshlennosti: analiticheskij obzor*. M.: Rosinformagrotek, 2020, 60 p. (In Russ.)].
8. Пискарев И.М. Образование перекиси водорода в водных растворах под действием УФ-С излучения. *Химия высоких энергий*, 2018, т. 52, № 3, с. 194-198 [Piskarev I.M. Obrazovanie perekisi vodoroda v vodnih rastvorah pod dejstviem UF-C izlucheniya. *Khimiya visokikh energy*, 2018, vol. 52, no. 3, pp. 194-198 (In Russ.)].
9. 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.Yu., Apasheva L.M., Lobanov A.V., Ovcharenko E.N., Turbin V.V., Rozantsev M.V., Belyakov A.M., Kulik K.N. Povysheniye urozhaynosti ozimoy psheniцы s pomoshchyu ekologicheskii chistogo vodnogo rastvora peroksida vodoroda prirodnoј koncentracii. *Vestnik rossijskoј selskokhozayajstvennoј nauki*, 2022, № 4, с. 64-67 (In Russ.)].

Lobanov A.V., Ovcharenko E.N., Turbin V.V., Rozancev M.V., Belyakov A.M., Kulik K.N. Povishenie urozhnosti ozimoy pshenitsi s pomoshch'yu ekologicheskoi chistogo vodnogo rastvora peroksida vodoroda prirodnoy kontsentratsii. *Vestnik rossijskoy selskokhozyajstvennoy nauki*, 2022, no. 4, pp. 64-67, doi: 10.31857/2500-2082/2022/4/64-67 (In Russ.).

**INNOVATIVE METHODS FOR PROCESSING DOMESTIC FLAX INTO CELLULOSE AND BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR ITS PRE\_SOWING STIMULATING TREATMENT**  
**Budnik M.I.<sup>1</sup>, Apasheva L.M.<sup>2</sup>, Barnashova E.K.<sup>3</sup>, Vedutenko V.V.<sup>2</sup>, Vertikova E.A.<sup>3</sup>, Grudzinskiy A.V.<sup>1</sup>, Kasaikina O.T.<sup>2</sup>, Krugovov D.A.<sup>2</sup>, Ovcharenko E.N.<sup>2</sup>, Proletova N.V.<sup>4</sup>, Rostovtsev R.A.<sup>4</sup>, Savranskiy V.V.<sup>5</sup>, Simagin A.D.<sup>3</sup>, Smurova L.A.<sup>2</sup>, Taraskin K.A.<sup>6</sup>, Ushchapovskiy I.V.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Russian Academy of Missile and Artillery Sciences

*1st Myasnikovskaya St., 3, building 3, Moscow, 107564, Russia; e-mail: ziraf@mail.ru*

<sup>2</sup> N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics of RAS

*Kosygina St., 4, Moscow, 119991, Russia*

<sup>3</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy

*Timiryazevskaya St., 49, Moscow, 127434, Russia*

<sup>4</sup> Federal Scientific Center of Bast Crops

*Komsomolsky Ave., 17/56, Tver, 170041, Russia*

<sup>5</sup> Federal Research Center «A.M. Prokhorov Institute of General Physics of RAS»

*Vavilova St., 38, Moscow, 119991, Russia*

<sup>6</sup> Scientific Research Institute of Applied Acoustics

*May 9 St., 7A, Dubna, 141981, Russia*

Received 10.08.2024

**Abstract.** A method of pre-sowing treatment of flax seeds to stimulate growth, development and increase stress resistance of plants is proposed, based on treatment with two-frequency laser pulsed radiation produced on copper vapor, having the following output characteristics: wavelengths of 510.6 nm (green radiation line) and 578.2 nm (yellow radiation line), pulse duration of 15 ns, repetition rate 10 kHz, the total pulse power is 10 kW, the energy-power ratio between the green and yellow radiation lines is 3:1. The interaction of laser radiation with wavelengths of 510.6 and 578.2 nm in the nonlinear medium of the seed caused the formation of additional wavelengths: a total wavelength of 271 nm (ultraviolet radiation) and a difference wavelength of 4.37 microns. The effect of irradiation of seeds was tested during three stages of plant development. The experimental testing indicators exceeded the control values. Methods of extracting cellulose from flax were compared: an ecological modification of the traditional method of cooking vegetable raw materials with solutions of sodium hydroxide and bisulfite followed by bleaching with hydrogen peroxide and a waste-free oxidative-catalytic method for liberating cellulose from lignin, hemicellulose and other components using a heterogeneous catalyst based on iron (III) oxides and hydrogen peroxide. The quality of the cellulose obtained depends on the ratio of the amount of reagents (biomass, catalyst, hydrogen peroxide) and the processing time. The liquid fraction of the products of oxidative cracking of raw materials is an aqueous solution of low molecular weight products, it can be used as a plant growth stimulant.

**Key words:** *flax, copper vapor laser, cellulose, oxidation-catalytic method, heterogeneous catalyst, cracking.*

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ЖАБРАХ МОРСКОГО ЕРША *SCORPAENA PORCUS LINNAEUS, 1758* ИЗ РАЗНЫХ АКВАТОРИЙ Г. СЕВАСТОПОЛЯ

Скуратовская Е.Н.<sup>1</sup>, Чекмарева Т.М.<sup>1</sup>, Левина Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

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

<sup>2</sup> ГБОУ ЦДО «Малая академия наук», Морской колледж

просп. Генерала Острякова, 163, г. Севастополь, 299005, РФ; e-mail: chekmareva@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 12.08.2024

**Аннотация.** Показатели рыб могут отражать экологическое состояние водной среды. Среди них наиболее информативными являются параметры прооксидантно-антиоксидантной системы (ПАС). Работа посвящена биоиндикационной оценке трех севастопольских бухт (Ласпи, Карантинная, Стрелецкая) с применением показателей ПАС жабр морского ерша *Scorpaena porcus*. В качестве показателей ПАС исследовали активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), пероксидазы (ПЕР)) и параметры окислительного стресса (уровень окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов). В результате проведенных исследований установлено достоверное увеличение параметров окислительного стресса, активности КАТ, снижение активности ПЕР при неизменных значениях СОД в жабрах рыб из Стрелецкой бухты по сравнению с другими акваториями. Полученные результаты свидетельствуют о смещении прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону интенсификации процессов окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов у рыб из Стрелецкой бухты, а также о высоком уровне загрязнения и менее благоприятных условиях обитания гидробионтов в данной акватории. Исследованные в жабрах морского ерша показатели ПАС можно рекомендовать, наряду с другими параметрами, в качестве биомаркеров для оценки качества морской среды.

**Ключевые слова:** рыбы, жабры, биомаркеры, активность антиоксидантных ферментов, показатели окислительного стресса, Черное море.

### ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития цивилизации прибрежная часть Мирового океана все больше вовлекается в сферу активной хозяйственной деятельности человека. Антропогенное воздействие приводит к изменению физико-химических параметров среды, аккумуляции разнообразных токсикантов в воде, грунтах и гидробионтах, изменению и сокращению биоразнообразия, трансформации экосистем. Акватории Крымского побережья не являются исключением. В них попадают речные, промышленные и хозяйственно-бытовые сточные воды, сливы с морского транспорта. В результате формируются зоны с высокими концентрациями загрязняющих веществ в воде и донных осадках. Токсиканты поглощаются и накапливаются гидробионтами, вызывая интоксикацию, различные функциональные изменения и нарушения [1-4].

В связи со сложившейся ситуацией в настоящее время широко используются методы биоиндикации, отражающие экологическое состояние акваторий и реакцию гидробионтов на комплексное воздействие среды. Применение данного подхода требует подбора биоиндикаторных видов и информативных показателей (биомаркеров), по которым можно оценить степень нарушения биологических функций гидробионтов в условиях многофакторного антропогенного воздействия [4-10]. В качестве биоиндикаторных видов широко используют рыб, так как они являются представителями высшего трофического звена в прибрежных сообществах, а также удобными и доступными объектами для исследований [4,6-9]. Одним из таких объектов является морской ерш *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758, широко распространенный малоподвижный оседлый вид донной прибрежной ихтиофауны Черного моря. Для решения задач биоиндикации широко применяются чувствительные и информативные биохимические маркеры, позволяющие в достаточно краткие сроки выявить механизмы воздействия комплекса негативных факторов среды на конкретные звенья метаболизма, определить основную стратегию и особенности структурно-функциональных изменений в организме при адаптации к неблагоприятным условиям обитания. К наиболее релевантным для биоиндикационных исследований биомаркерам относят показатели прооксидантно-антиоксидантной системы (ПАС) – активность антиоксидантных (АО) ферментов, содержание низкомолекулярных антиоксидантов, уровень окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8-10]. В работах многих авторов показана зависимость между уровнем комплексного загрязнения среды обитания и откликами параметров ПАС в различных тканях и органах рыб [4-7]. Жабры рыб как барьерный орган постоянно подвергаются воздействию факторов окружающей среды, включая токсичные агенты, и служат одним из основных путей проникновения ксенобиотиков в организм гидробионтов, поэтому показатели жабр целесообразно использовать в биоиндикационных исследованиях [5,11].

Цель работы – с применением показателей ПАС в жабрах морского ерша *Scorpaena porcus* провести биоиндикационную оценку трех севастопольских бухт.



Рисунок 1. Районы исследований

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Ихтиологический материал был собран в июне 2023 г. в трех севастопольских бухтах с разным уровнем антропогенной нагрузки: Ласпи, Карантинной, Стрелецкой (рис. 1).

**Характеристика районов исследований.** Бухта Ласпи является большой открытой бухтой, расположенной на Южном берегу Крыма. Оценка динамической активности вод показывает, что процесс водообмена в районе бухты Ласпи происходит довольно интенсивно, что свидетельствует о благополучном экологическом состоянии акватории [12]. В б. Ласпи донные отложения представлены в основном песками, слабо сорбирующими гидрофобные загрязняющие вещества. Концентрация хлорорганических загрязнителей и нефтяных углеводородов здесь намного ниже, чем в других исследуемых районах [1].

Бухта Карантинная расположена к западу от южного заградительного мола. Это самая малая бухта в системе севастопольских бухт, в которой постоянно базируются корабли. Прибрежная акватория Карантинной бухты - зона экологической реабилитации вод, так как, несмотря на наличие аварийного выпуска хозяйственно-бытовых сточных вод и «соседства» с сильно загрязненной Севастопольской бухтой, в ней в результате активного водообмена с прилегающей частью моря и мидийной фермой процессы деструкции органического вещества протекают достаточно интенсивно. Это, возможно, определяет и широкое видовое разнообразие макрозообентоса естественных твердых субстратов (скал) в этой бухте [13].

Стрелецкая бухта является одной из наиболее подверженных антропогенному прессу акваторий г. Севастополя. Вдоль восточного побережья базируются корабли Черноморского флота. Западное побережье занято городскими жилыми застройками. В последние десятилетия наблюдается изменение «качества» антропогенной нагрузки в данной акватории, в частности за счёт интенсивной застройки береговой полосы коммунальными и гостинично-туристическими комплексами, расширения сети причалов для судов малого (прогулочного) флота. Для осадков Стрелецкой бухты характерны заиленные ракушняки, пески и чёрные илы. Рыхлые грунты б. Стрелецкой представлены в основном алеврито-пелитовыми фракциями, обладающими наибольшей аккумулярующей способностью, в связи с чем бухта характеризуется высоким загрязнением донных осадков хлорорганическими соединениями и нефтяными углеводородами [1,2,14,15].

Таким образом, Стрелецкая бухта является наиболее загрязненной по сравнению с остальными акваториями. Средней степенью комплексного загрязнения характеризуется Карантинная бухта. Бухту Ласпи можно рассматривать как относительно чистую акваторию.

**Биологический и биохимический анализ.** В лаборатории проводили полный биологический анализ, включающий измерение общей и стандартной длины, определение стадии зрелости, возраста, пола, массы рыбы и тушки, печени, гонад. Для биохимических исследований отбирали жабры экземпляров в возрасте 3-х лет, преобладающих в уловах. Жабры несколько раз промывали холодным 0.85% физиологическим раствором, после чего гомогенизировали. Для получения супернатантов гомогенаты центрифугировали 15 мин при 10000 g и температуре 0–4°C в рефрижераторной центрифуге MPW-352R (MPW Med. Instruments, Польша). Все биохимические показатели определяли в супернатантах. В качестве биохимических параметров анализировали активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), пероксидазы (ПЕР), показатели окислительного стресса – уровень ОМБ и содержание ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП), отражающих уровень ПОЛ, методами, описанным в работе [7]. Уровень ОМБ регистрировали при четырех длинах волн: 356 нм и 370 нм (альдегидные и кетонные продукты окислительной модификации нейтрального характера), а также при 430 нм и 530 нм (альдегидные и кетонные продукты окислительной модификации основного характера). Все определения проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Биохимические показатели пересчитывали на 1 мг белка сырой массы ткани, концентрацию которого определяли с использованием стандартного набора реагентов.

**Статистическая обработка результатов.** Результаты биохимического анализа обрабатывали статистически, вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку средней. Достоверность различий между выборками оценивали с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

Таблица 1. Показатели окислительного стресса в жабрах морского ерша из трех бухт

Параметр	Б. Ласпи (n=12)	Б. Карантинная (n=12)	Б. Стрелецкая (n=12)
ТБКРП, нмоль/мг бел.	5,23±0,5*	5,14±0,43*	9,27±0,67
C356, ед. опт. плот./мг бел.	0,107±0,007*	0,106±0,01*	0,150±0,020
C370, ед. опт. плот./мг бел.	0,108±0,005*	0,094±0,01*	0,136±0,014
C430, ед. опт. плот./мг бел.	0,056±0,004*	0,054±0,006*	0,076±0,006
C530, ед. опт. плот./мг бел.	0,019±0,003*	0,025±0,004	0,028±0,003

Примечание: ТБКРП - ТБК-реактивные продукты, альдегидные (C<sub>356</sub>) и кетонные (C<sub>370</sub>) продукты нейтрального характера; альдегидные (C<sub>430</sub>) и кетонные (C<sub>530</sub>) продукты основного характера \*- различия достоверны по сравнению со из Стрелецкой бухты

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что уровень окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов в жабрах рыб из Стрелецкой бухты достоверно превышает значения особей из других районов ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, 3).

Активность СОД в жабрах морского ерша из разных районов не отличалась. Активность КАТ у рыб из б. Стрелецкой достоверно превышала значения особей из б. Ласпи и б. Карантинной ( $p < 0,05$ ). Активность ПЕР в жабрах экземпляров из б. Ласпи и б. Карантинной значительно превышала (более чем в два раза) значения рыб из б. Стрелецкой (табл. 2).

Баланс процессов свободнорадикального окисления и АО защиты отражает адаптационные возможности и позволяет оценить ответные реакции организмов на неблагоприятные факторы среды, а его смещение приводит к патологическим изменениям, повреждению молекулярных и клеточных структур, развитию окислительного стресса [8-10]. В природных и экспериментальных условиях для оценки реакции организма на действие отдельных загрязнителей или их комплекса проводится анализ соотношения интенсивности перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков с реакциями ферментативной АО системы. Увеличение активности АО ферментов при неизменных или низких значениях показателей окислительного стресса (уровень ПОЛ и ОМБ) интерпретируют как адаптивную реакцию организма. Увеличение активности АО ферментов совместно с уровнем ПОЛ и ОМБ – как адаптивную компенсаторную реакцию. Снижение или сравнительно низкая активность АО ферментов на фоне высокого содержания продуктов ПОЛ и ОМБ свидетельствует о сдвиге прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону процессов свободно-радикального окисления биомолекул и развитии окислительного стресса, предшествующего патологическим состояниям в организме [4-7].

Обнаруженное в наших исследованиях повышение уровня ОМБ и ПОЛ в жабрах рыб б. Стрелецкой может указывать на усиление свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса. В то же время, увеличение активности КАТ на фоне повышения содержания окисленных форм белков и липидов может свидетельствовать об адаптивном компенсаторном характере ответной реакции на комплексное загрязнение. Однако значительное снижение активности ПЕР и отсутствие реакции со стороны СОД может быть результатом ингибирующего действия высоких концентраций токсикантов в Стрелецкой бухте. Ранее проведенные нами исследования показали, что в печени морского ерша из Стрелецкой бухты уровень ПОЛ, ОМБ, активность КАТ и СОД были достоверно выше, а ПЕР ниже, по сравнению с менее загрязненными Казачьей и Карантинной бухтами. В крови рыб из Стрелецкой бухты уровень ОМБ был выше, тогда как активность СОД, КАТ и ПЕР ниже, чем в

Таблица 2. Активность антиоксидантных ферментов в жабрах морского ерша из трех бухт

Параметр	Б. Ласпи (n=12)	Б. Карантинная (n=12)	Б. Стрелецкая (n=12)
СОД, ед. опт. плот./мг бел./мин	32,54±2,39	36,85±2,4	32,7±3,27
КАТ, мкат/мг бел.	0,052±0,002*	0,047±0,004*	0,061±0,003
ПЕР, ед. опт. плот./мг бел./мин	4,38±0,36*	4,29±0,62*	2,11±0,26

Примечание: СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ПЕР – пероксидаза, \*- различия достоверны по сравнению со значениями рыб из Стрелецкой бухты.

акваториях Казачьей и Карантинной бухт [4,6]. Полученные результаты позволили сделать вывод от том, что отклик параметров ПАС рыб имеет органно-тканевые особенности, что отмечается другими исследователями. Например, сравнительный анализ показателей окислительного стресса в печени, почках, жабрах и сердце африканского сом *Clarias gariepinus* из реки Огун, загрязненной промышленными отходами, включая тяжелые металлы, и рыбоводческой фермы Агоди (Нигерия) показал, что активность СОД была выше на 61% в печени, на 50% в почках и на 28% в сердце, в то время как значительное снижение (44%) наблюдалось в жабрах рыб из реки по сравнению с рыбоводческой фермой. Напротив, активность САТ была на 46%, 41%, 50% и 19% ниже в печени, почках, жабрах и сердце соответственно. Уровень ПОЛ был значительно выше в печени, почках, жабрах и сердце на 177%, 102%, 168% и 71% соответственно по сравнению с показателями рыб на рыбоводческой ферме. В целом, результаты исследований отражали присутствие тяжелых металлов, вызывающих окислительный стресс, в органах африканского сома из реки Огун, [18].

Сходные с морским ершом ответные реакции прооксидантно-антиоксидантной системы были отмечены в печени биоиндикаторного вида бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* в условиях высокого загрязнения водной среды. Повышение уровня ПОЛ, снижение активности СОД и ПЕР при неизменных значениях КАТ наблюдалось в печени рыб из Таганрогского залива Азовского моря по сравнению со значениями экземпляров из предпроливья и открытой части моря. Полученные результаты свидетельствовали об ингибировании активности СОД, ПЕР, разбалансировке процессов обезвреживания перекисей и смещение прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону ПОЛ в печени рыб из Таганрогского залива и менее экологически благополучном состоянии этой локации по сравнению с другими районами исследований [7].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено достоверное увеличение уровня окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов, активности КАТ, снижение активности ПЕР при неизменных значениях СОД в жабрах рыб из Стрелецкой бухты по сравнению с другими акваториями. Полученные результаты свидетельствуют о смещении прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону интенсификации процессов окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов у рыб из Стрелецкой бухты, а также о высоком уровне загрязнения и менее благоприятных условиях обитания гидробионтов в данной акватории. Исследованные в жабрах морского ерша показатели ПАС можно рекомендовать наряду с другими параметрами в качестве биомаркеров для оценки качества морской среды.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Биоразнообразие как основа устойчивого функционирования морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения» (№ гос. Регистрации 124022400148-4).*

### Список литературы / References:

1. Малахова Л.В., Скуратовская Е.Н., Малахова Т.В., Болтачев А.Р., Лобко В.В. Хлорорганические соединения в ерше *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в акватории Севастополя (Чёрное море): пространственное распределение и биологический отклик на уровень накопления загрязнителей. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 4, с. 51-63 [Malakhova L.V., Skuratovskaya E.N., Malakhova T.V., Boltachev A.R., Lobko V.V. Organochlorine compounds in scorpion fish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 in the Sevastopol marine area (The Black sea): spatial distribution and biological response. *Marine Biological Journal*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 51-63, doi: 10.21072/mbj.2018.03.4.06 (In Russ.)].
2. Тихонова Е.А., Котельянец Е.А., Волков Н.Г. Характеристика загрязнения донных отложений прибрежной акватории Севастополя на примере Стрелецкой бухты (Черное море). *Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря*, 2018, № 1, с. 74-80 [Tikhonova E.A., Kotelyanets E.A., Volkov N.V. Characteristic of pollution of the bottom deposits in the coastal area of Sevastopol on the example of the Streletskaia bay (The Black sea) *Ecological safety of coastal and shelf zones of sea*, 2018, no. 1, pp. 74-80, doi: 10.22449/2413-5577-2018-1-74-80 (In Russ.)].
3. *Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века*. Под ред.: О.Г. Миронова, С.В. Алёмова; Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН.- Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018, 276 с. [*Sanitary and biological studies of the south-western Crimea coastal waters at the beginning of XXI century*. Eds: O.G. Mironov, S.V. Alyomov. Simferopol.: Arial, 2018, 276 p. (In Russ.)].
4. Rudneva I.I., Skuratovskaya E.N., Chesnokova I. I., Shaida V.G., Kovyrshina T.B. Biomarker response of Black Sea scorpion fish *Scorpaena porcus* to anthropogenic impact. *Advances in Marine Biology*. vol. 1. A. Kovács, P. Nagy (Eds). New York: Nova Sci. Publs, 2016, vol. 5, pp. 119-147.
5. Abhijith B.D., Ramesh M., Poopal R.K. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 2016, vol. 77, pp. 31-40.
6. Chesnokova I.I., Sigacheva T.B., Skuratovskaya E.N. Comparative Analysis of Hepatic Biomarkers of Black Scorpionfish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 from Sevastopol Water Areas (the Black Sea) with Different Pollution Levels. *Water Resources*, 2020, vol. 47, iss. 3, pp. 486-490, doi: 10.1134/S0097807820030045.

7. Sigacheva T.B., Skuratovskaya E.N. Combined application of biochemical and chemical parameters in the liver of round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) for assessing the quality of water bodies. *Regional Studies in Marine Science*, 2023, vol. 65, art. no. 103113, 9 p., doi: 10.1016/j.rsma.2023.103113.
8. Stoliar O.B., Lushchak V.I. Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. In *Oxidative Stress – Environmental Induction and Dietary Antioxidants*. Ed. V. Lushchak, 2012, pp. 131-166.
9. Kroon F., Streten C., Harries S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 4, e0174762, doi: 10.1371/journal.pone.0174762.
10. Lomartire S., Marques J.C., Goncalves A.M.M. Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems. *Ecological Indicators*, 2021, vol. 122, 107207, doi: 10.1016/j.ecolind.2020.107207.
11. Моисеенко Т.И. *Водная экотоксикология: теоретические и прикладные аспекты*. М.: Наука, 2009, 400 с. [Moiseenko T.I. *Aquatic ecotoxicology: theoretical and applied aspects*. М.: Nauka, 2009, 400 p. (In Russ.)].
12. Панкеева Т.В. Пространственное распределение макрофитобентоса с учетом ландшафтной структуры дна в бухте Ласпи (Черное море). *Вестник Удмуртского университета*, 2019, т. 29, вып. 1, с. 111-123 [Pankeeva T.V. Spatial distribution of macrophytobenthos taking into account the landscape structure of the day in Laspi Bay (Black Sea). *Vestnik Udmurtskogo universiteta*, 2019, vol. 29, no. 1, pp. 111-123 (In Russ.)].
13. Макаров М.В., Бондаренко Л.В., Витер Т.В., Подзорова Д.В. Обрастания твердых искусственных субстратов в сезонном аспекте у побережья Севастополя (Юго-Западный Крым, Черное море). *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*, 2019, т. 5 (71), № 2, с. 116-131 [Makarov M.V., Bondarenko L.V., Viter T.V., Podzorova D.V. Fouling of solid artificial substrates in a seasonal aspect off the coast of Sevastopol (South-Western Crimea, the Black Sea). *Uchenyye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo*. *Biologiya. Khimiya*, 2019, vol. 5 (71), no. 2, pp. 116-131 (In Russ.)].
14. Осадчая Т.С. Нефтяные углеводороды в донных осадках прибрежных акваторий г. Севастополя (Чёрное море). *Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development*, 2013 [Osadchaya T.S. Oil hydrocarbons in bottom sediments of Sevastopol coastal areas (the Black Sea). *Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development*, 2013 (In Russ.)].
15. Тихонова Е.А., Котельянец Е.А., Соловьёва О.В. Оценка уровня загрязнения донных отложений крымского побережья Черного и Азовского морей. *Принципы экологии*, 2016, № 5 (21), с. 56-70 [Tikhonova E.A., Kotelyanets E.A., Soloveva O.V. Assessment of the level of pollution of bottom sediments of the Crimean coast of the Black and Azov Seas. *Printsipy ekologii*, 2016, no. 5 (21), pp. 56-70 (In Russ.)].
16. Rudneva I.I., Skuratovskaya E.N., Dorohova I.I., Kovyrshina T.B. Application fish blood biomarkers in evaluation of marine environment health. *World Journal of Science and Technology*, 2012, vol. 2, no. 7, pp. 19-25.
17. Rudneva I.I., Kovyrshina T.B., Skuratovskaya E.N. Use of fish blood serum biomarkers for evaluating of Black Sea coastal waters health. *European Journal of Zoological Research*, 2015, vol. 4, iss.1, pp. 37-41.
18. Farombi E.O., Adelowo O.A., Ajimoko Y.R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2007, vol. 4, no. 2, pp. 158-165, doi: 10.3390/ijerph2007040011.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN THE GILLS OF BLACK SCORPIONFISH *SCORPAENA PORCUS* LINNAEUS, 1758 FROM DIFFERENT WATER AREAS OF SEVASTOPOL

Skuratovskaya E.N.<sup>1</sup>, Chekmareva T.M.<sup>1</sup>, Levina N.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

*Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia*

<sup>2</sup> "Younior Academy of Sciences", Marine College

*General Ostryakov Ave., 163, Sevastopol, 299055, Russia; e-mail: chekmareva@ibss-ras.ru*

Received 12.08.2024

**Abstract.** Fish parameters can reflect the ecological state of the aquatic environment. Among them, the parameters of the prooxidant-antioxidant system (PAS) are the most informative biomarkers. The work is devoted to the bioindication assessment of three Sevastopol bays (Laspi, Karantinnaya, Streletskaaya) using the PAS parameters of the gills of black scorpionfish *Scorpaena porcus*. The activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PER)) and oxidative stress parameters (the level of oxidized proteins and lipid peroxidation) were studied as PAS parameters. A reliable increase in oxidative stress parameters, CAT activity, a decrease in PER activity with unchanged SOD values in the gills of fish from Streletskaaya Bay compared to other water areas were found. The obtained results indicate a shift in prooxidant-antioxidant reactions towards intensification of the processes of protein oxidation and lipid peroxidation in gills of specimens from Streletskaaya Bay, as well as a high level of pollution and less favorable living conditions for aquatic organisms in this water area. PAS parameters studied in the gills of the black scorpionfish can be recommended, along with other characteristics, as biomarkers for assessing the quality of the marine environment

**Key words:** fish, gills, biomarkers, activity of antioxidant enzymes, indicators of oxidative stress, Black Sea.

## МОНИТОРИНГ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТОТИПОВ АНТИОБРАСТАЮЩИХ ПОКРЫТИЙ В ХОДЕ ЭКСПОНИРОВАНИЯ В МОРСКОЙ СРЕДЕ

Мутовкин П.А., Мосунов А.А., Дегтяр А.Д.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: pasha.mutovkin2001@mail.ru

Поступила в редакцию 14.08.2024

**Аннотация.** Морской транспорт является одним из наиболее востребованных способов доставки грузов и пассажиров. Однако длительное воздействие водной среды и находящейся в ней организмов приводит к развитию пленки обрастания на поверхности, что может повредить материал, а также увеличить затраты на техническое обслуживание и потребление топлива. Основными методами защиты от этого являются антиобрастающие покрытия. В данной работе впервые исследованы физико-механические свойства антиобрастающей краски, содержащей в качестве основного антиобрастающего агента наночастицы металлов и их оксидов оригинальной формы, методами атомно-силовой микроскопии. В качестве органической матрицы покрытия использовались различные составы, изготовленные на основе акрилатной и эпоксидной смол, канифоли и др., а также органической основы эмали РК-Marine с заменой антиобрастающих компонентов на исследуемые наночастицы. В качестве противообрастающих агентов использовались следующие наночастицы: ZnO-FeZnO, CuO-FeCuO, ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-ZnO, ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> и Ag-TiO<sub>2</sub>. Их процентное содержание составляло 10-20%. При помощи атомно-силовой микроскопии были исследованы параметры шероховатости антиобрастающих покрытий. Для достижения более точных результатов был разработан специализированный код на языке R, который позволяет вычислить среднее арифметическое отклонение профиля шероховатости Ra с предварительно заданной абсолютной погрешностью.

**Ключевые слова:** биообрастание поверхности, антиобрастающие краски, наночастицы, атомно-силовая микроскопия.

Морской транспорт играет важную роль в мировой экономике, обеспечивая перевозку грузов и пассажиров. За последние 20 лет его доля выросла на 20%. Согласно информации организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), морской транспорт составляет 62% от мирового объема транспорта, что соответствует \$14 триллионов. Однако одной из основных проблем эксплуатации морского транспорта является биологическое обрастание корпусов кораблей и судов. Рост биообрастания на субстрате в водной среде представляет собой сложный процесс с начальным образованием биопленок (состоящих из микробов и микроводорослей) с последующим заселением личинок беспозвоночных, спор водорослей, бактерий, грибов, фитопланктона, моллюсков и др. Биообрастание на подводных поверхностях в морской среде имеет большое экологическое и экономическое значение, особенно серьезные последствия оно несет для судоходства, морской аквакультуры и прибрежной промышленности [1]. Последствия в основном связаны с потерей продуктивности в аквакультуре, повышением затрат на топливо для перевозки, а также издержек, связанных с периодической очисткой подводной части кораблей и повторной покраской в условиях судоремонтных заводов. [2]. Согласно некоторым подсчетам, использование судов с чистыми корпусами, свободными от биообрастания, могло бы снизить выбросы CO<sub>2</sub> на одну пятую, а расходы на топливо - на 19%. Таким образом можно сэкономить до 6,5 миллионов долларов только на топливе [3]. Существуют различные методы защиты от биообрастания, при этом одним из наиболее часто используемых является нанесение на защитную поверхность антиобрастающей краски. Различают несколько типов таких красок: SMT (Soluble Matrix Type Paints) - они основаны на использовании в качестве пленкообразователя канифоли; TBT-free (Selfpolishing) - это системы на основе акрилатов меди, кремния или цинка, без канифоли, без трибутилолова (TBT); Non-Stick - это противообрастающие покрытия на основе кремний- или фторсодержащих полимеров с низким модулем упругости [4].

В данной работе впервые исследованы физико-механические свойства антиобрастающей краски, содержащей в качестве основного антиобрастающего агента наночастицы металлов и их оксидов оригинальной формы, методами атомно-силовой микроскопии. В качестве органической матрицы покрытия использовались различные составы, изготовленные на основе акрилатной и эпоксидной смол, канифоли и др., а также органической основы эмали РК-Marine с заменой антиобрастающих компонентов на исследуемые наночастицы. В качестве противообрастающих агентов использовались следующие наночастицы: ZnO-FeZnO, CuO-FeCuO, ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-ZnO, ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> и Ag-TiO<sub>2</sub>. Их процентное содержание в покрытии лежало в диапазоне 10-20% по массе. Выбор массовой доли наночастиц в краске обусловлен тем, что добавление менее 10% наночастиц не создают значимого антиобрастающего эффекта на поверхности, что приводит к уменьшению эффективности краски. С другой стороны, добавление более 20% наночастиц может привести к их агломерации, которая увеличивает шероховатость поверхности и способствует росту биообрастания. Также, высокое содержание наночастиц в составе приводит к повышению скорости его отверждения вплоть до невозможности нанесения на защищаемую поверхность.

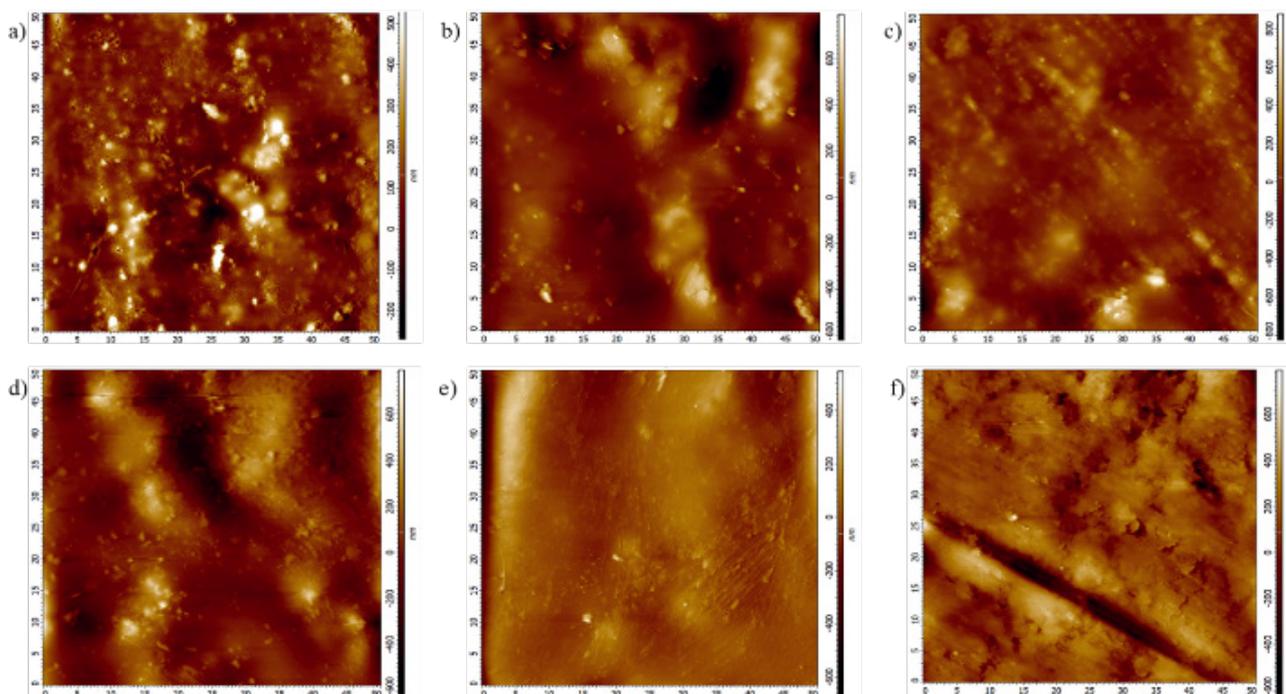
Методом атомно-силовой микроскопии проведены исследования микрошероховатости антиобрастающих покрытий. Сканирование поверхности осуществлялось в полуконтактном режиме. В качестве измерительного

зонда использовались консоли НА\_FM/W<sub>2</sub>C. Это микромеханические кремниевые устройства, состоящие из прямоугольного кремниевого основания размером 3,6 × 1,6 мм с толщиной верхнего края 0,4 мм. В центре меньшей стороны формируется балка длиной 223 мкм, шириной 34 мкм и толщиной 3 мкм. Верхняя поверхность балки покрыта отражающим золотым покрытием. На свободном конце нижней стороны балки сформирован наконечник высотой 9-16 мкм, с углом при вершине около 22° и радиусом кривизны не больше 10 нм. Этот наконечник служит в качестве измерительного зонда. Размер области сканирования был выбран 50 × 50 мкм, число точек по каждой из сторон – 1000, скорость – 0,5 Гц. Сканы всех исследуемых поверхностей приведены на рисунках 1 и 2.

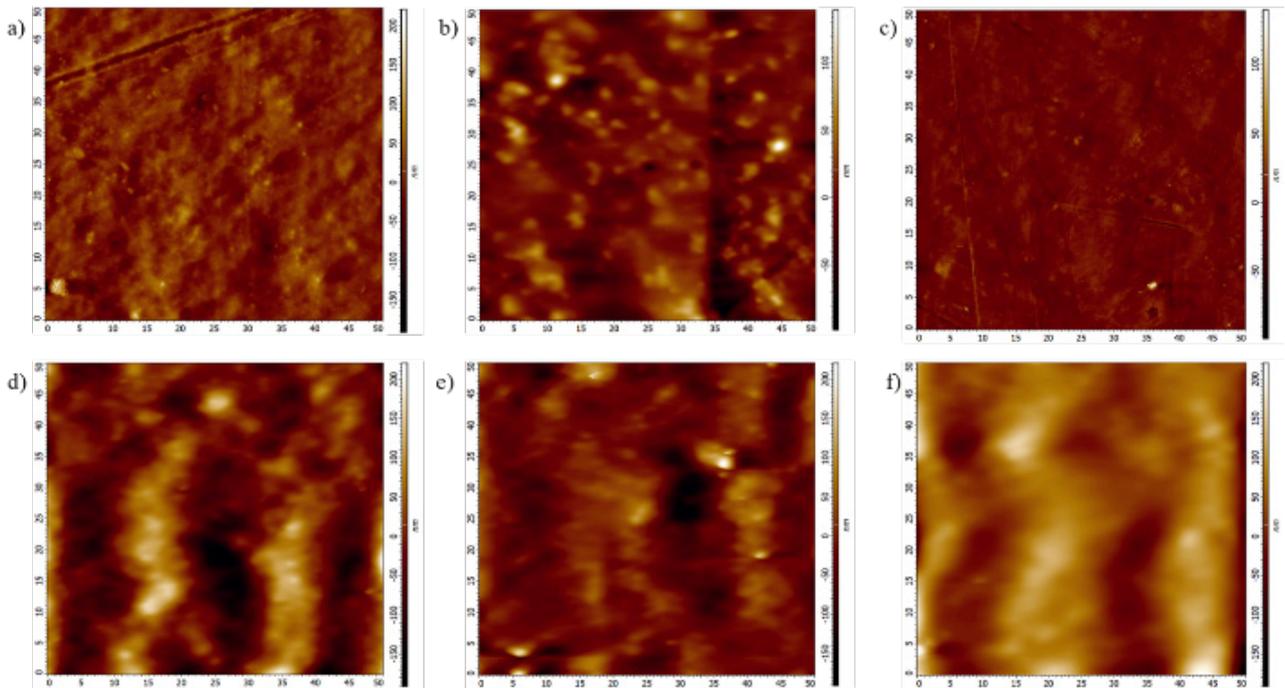
Одним из параметров, влияющих на эффективность и долговечность покрытия, является его гладкость, т.к. любые микрошероховатости, полости и тому подобные неровности могут стать «точками роста» для организмов-обрастателей. Поскольку первичная пленка обрастания имеет микроскопический размер, нам было необходимо провести анализ состояния поверхности в аналогичном масштабе. Классические средства оптической микроскопии не могут в полной мере помочь справиться с данной задачей, поскольку мы ожидаем зафиксировать в покрытии неровности в том числе нанометрового размера, так или иначе ассоциируемые с внесенными в краску активными частицами.

При решении данной задачи мы столкнулись со следующей проблемой: встроенное в АС-микроскоп ПО (версия «Nova SPM 4.0») не может рассчитать шероховатость всей поверхности, а только вдоль одной линии, было решено разработать код на языке R, позволяющий получить среднее арифметическое отклонение профиля шероховатости (значение Ra) с абсолютной погрешностью. Ее значение вычислялось стандартной процедурой языка, с использованием Т-статистики, коэффициент Стьюдента был выбран для надежности 0,95. Пример кода программы приведен ниже.

```
# Функция для вычисления Ra значения для одной строки данных:
calculate_Ra_row <- function(row){
sr <- mean(row) # Находим среднее значение строки
sum <- sum(abs(row - sr)) # Находим сумму абсолютных разностей между значениями и средним
ra <- sum / length(row) # Вычисляем Ra значение
return(ra)
}
data <- read.table("C:\\Users\\user\\Desktop\\Мутовкин Павел\\Шероховатость\\ПК-Marine.txt", header
= F) # Считываем данные
ra <- apply(data, 1, calculate_Ra_row) # Применяем функцию calculate_Ra_row к каждой строке
данных
Ra <- mean(ra) # Вычисляем среднее значение Ra по всем строкам
t <- qt(1-0.05/2, nrow(data) - 1) # Получаем критическое значение t-статистики
S <- t * (sd(ra) / sqrt(nrow(data))) # Рассчитываем абсолютную погрешность Ra
print(paste(Ra, "+", S)) # Выводим финальное значение Ra с абсолютной погрешностью
```



**Рисунок 1.** Сканы поверхности образцов: а) Ag-TiO<sub>2</sub>; б) CuO-FeCuO; в) ZnO-FeZnO; г) ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub>; д) ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-ZnO; е) Bioplast-52



**Рисунок 2.** Сканы поверхности образцов: а) Bioplast-52; б) Основа «Bioplast-52» + Ag-TiO<sub>2</sub>; в) Основа «Bioplast-52» + CuO-Cu<sub>2</sub>O-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; д) PK-Marine; е) PK-Marine + Ag-TiO<sub>2</sub>

Для корректной обработки данные, полученные в программе Nova SPM, были сохранены в формате .txt, после чего к ним был применен вышеописанный код, написанный на языке R. По итогам применения данного кода к сканам всех изучаемых образцов, были получены значения среднего арифметического отклонения профиля шероховатости Ra для каждого из них. Рассчитанные результаты приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Среднее арифметическое отклонение профиля шероховатости Ra, полученные с помощью кода на языке R

Образец	Среднее арифметическое отклонение профиля шероховатости Ra, нм
Bioplast-52	119,27 ± 2,53
Основа «Bioplast-52»	14,87 ± 0,30
Основа «Bioplast-52» + Ag-TiO <sub>2</sub>	22,15 ± 0,52
Основа «Bioplast-52» + CuO-Cu <sub>2</sub> O-CuFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	40,92 ± 0,93
PK-Marine	33,75 ± 0,84
PK-Marine + CuO-Cu <sub>2</sub> O-CuFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	38,25 ± 1,10
PK-Marine + Ag-TiO <sub>2</sub>	29,77 ± 0,68
Bioplast-52	137,40 ± 2,28
Эпоксидная смола + Ag-TiO <sub>2</sub>	73,85 ± 1,45
Эпоксидная смола + CuO-FeCuO	95,97 ± 2,36
Эпоксидная смола + ZnO-FeZnO	106,21 ± 2,01
Эпоксидная смола + ZnTi <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -TiO <sub>2</sub>	86,04 ± 1,80
Эпоксидная смола + ZnTi <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -ZnO	71,58 ± 1,30

Общая идея работы состояла в том, чтобы найти соответствие между ранее полученными макроскопическими параметрами трения полученной поверхности с микроскопическими характеристиками покрытия. Исследование микрошероховатости антиобрастающих покрытий с использованием АСМ показало, что внедрение наночастиц Ag-TiO<sub>2</sub> снижает среднее арифметическое отклонение профиля шероховатости (Ra) по сравнению с эмалью Bioplast-52 и РК-Marine, что улучшает физико-механические свойства краски. Для других исследованных наночастиц результаты оказались менее успешными, чем у эталонных образцов (коммерческих красок Bioplast-52 и РК-Marine). Также нами ранее были получены значения статического и динамического коэффициентов трения (статья в процессе публикации), которые показали, что минимальные значения наблюдаются для образца, покрытого краской Bioplast-52 ( $0,128 \pm 0,009$ ;  $0,073 \pm 0,004$  соответственно). Краски с наночастицами CuO-FeCuO и Ag-TiO<sub>2</sub> показали результаты, близкие к покрытию Bioplast-52 (CuO-FeCuO:  $0,154 \pm 0,021$ ;  $0,144 \pm 0,017$ ; Ag-TiO<sub>2</sub>:  $0,147 \pm 0,002$ ;  $0,122 \pm 0,005$ ). Следовательно, можно заключить, что данные по микрошероховатости и макроскопическим коэффициентам трения взаимосвязаны, и наилучшие результаты наблюдаются у краски с добавлением наночастиц Ag-TiO<sub>2</sub>. Результаты натурального биологического эксперимента, поставленного в Севастопольской бухте Черного моря (данные готовятся к публикации в профильном журнале) показывают, что коммерческая эмаль Bioplast-52 демонстрирует высокую эффективность в борьбе с организмами-обрастателями, что свидетельствует о ее потенциальной прочности и устойчивости к биологическим организмам в реальных условиях эксплуатации. Поскольку краски с использованием наночастиц Ag-TiO<sub>2</sub> показали наилучшие результаты в эксперименте на машине трения и атомно-силовом микроскопе, это дало нам основание ожидать сопоставимого эффекта в натурном эксперименте.

Однако, следует заметить, что в силу дороговизны компонентов, входящих в состав данной частицы, полная замена антиобрастающего агента на частицы Ag-TiO<sub>2</sub> вряд ли будет коммерчески успешна. Также в силу того, что оба этих металла являются тяжелыми, следует провести дополнительный комплекс исследований, доказывающий отсутствие побочной токсичности данных препаратов на сообщество «нецелевых» гидробионтов. Первый этап такого исследования был уже проведен нами в работе [5].

Резюмируя все вышесказанное, мы делаем вывод, что наряду с исследованиями наночастиц, содержащих серебро и титан, целесообразно также провести дополнительные исследования по оптимизации способа приготовления и нанесения покрытия, содержащего частицы меди и железа.

#### Список литературы / References:

1. Gu Y. Q., Mou J. G., Dai D. S., Zheng S. H., Jiang L. F., Wu D. H., Ren Y., Liu F. Q. Characteristics on drag reduction of bionic jet surface based on earthworm's back orifice jet. *Acta Phys. Sin.*, 2015, vol. 64, pp. 1-11.
2. Callow M. E., Callow J. E. Marine biofouling: A sticky problem. *Biologist*, 2002, vol. 49, no. 1, pp. 10-14.
3. Kamil md salim, Muslim M., Saat A. M. Effective Control of SOx and NOx Release to the Atmosphere from Emissions of Ship Propulsion Engines. *Adv. in Emerging Technologies and Engineering Applications*, 2020, pp. 91-100.
4. Maan A. M. C., Hofman A. H., de Vos W. M., Kamperman M. Recent Developments and Practical Feasibility of Polymer-Based Antifouling Coatings. *Adv. Funct. Mater.*, 2020, vol. 30, pp. 1-30.
5. Chelebieva E. S., Kladchenko E. S., Podolskaya M. S., Bogacheva E. A., Mosunov A. A., Andreyeva A. Yu Toxic effect of mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to Ag-TiO<sub>2</sub> and ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> bicomponent nanoparticles. *Chemosphere*, 2024, vol. 363, pp. 1-7.

## MONITORING OF CHANGES IN ANTI-FOULING COATING PROTOTYPES DURING EXPOSURE IN THE MARINE ENVIRONMENT

Mutovkin P.A., Mosunov A.A., Degtyar A.D.

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: pasha.mutovkin2001@mail.ru

Received 14.08.2024

**Abstract.** Sea transport is a popular method for delivering goods and passengers, but prolonged exposure to the water and the organisms that live in it can lead to the development of a foulant film on the surfaces, which can damage materials and increase maintenance costs and fuel consumption. To protect against this, antifouling coatings are used. In this study, the physicochemical properties of an antifouling paint with nanoparticles of metals and their oxides as the main antifouling agent were investigated using atomic force microscopy for the first time. Various compositions based on acrylic and epoxy resins, and the organic base of РК-Marine enamel were used as organic coating matrices, with antifouling nanoparticles replacing the usual antifouling ingredients. The nanoparticles used included ZnO-FeZnO, CuO-FeCuO, ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-ZnO, ZnTi<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> and Ag-TiO<sub>2</sub>. at a concentration of 10-20%. The roughness of antifouling coatings was studied using atomic force microscopy. To obtain more accurate results, we developed a specialized code written in the R programming language. This code allows us to calculate the arithmetic mean deviation of the roughness profile (Ra) with a predetermined absolute error.

**Key words:** biofouling of the surface, antifouling paints, nanoparticles, atomic force microscopy.