

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 10, № 1
2025**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 10, № 1
2025**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 10, No. 1, 2025**

Севастополь
2025

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);
Пеньков Н.В. (Пушино);
Пионтковский С.А. (Севастополь);
Ризниченко Г.Ю. (Москва);
Семенов К.Н. (Санкт-Петербург);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Холявка М.Г. (Воронеж);
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);
Penkov N.V. (Pushchino);
Piontkovski S.A. (Sevastopol);
Riznichenko G.Yu. (Moscow);
Semenov K.N. (Saint Petersburg);
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 10, № 1, 2025

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

В.В. Рощина, С.А. Богун, А.А. Абушин

Применение спектральных методов для поиска азулен-содержащих растений аридной зоны 7

Е.В. Шупова

Взаимодействие антибиотика норфлоксацина с полимерной ДНК в присутствии профлавина 15

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

Е.А. Гребнева

Механизм образования редких таутомеров оснований ДНК при облучении одноцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом 24

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

Молекулярное моделирование конформационного поведения и электронной структуры антимикробного тетрапептида WRWR 34

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, М.А. БельтовАгонист рецепторов сигма-1, соединение (+)-SKF-10047, подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах 39**В.Н. Лесных, А.В. Елистратов, В.А. Коломбет**

Программа для обработки итога сканирования мышления цепным вербальным тестом 46

А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, М.А. БельтовИнгибитор комплекса Agr2/3 , соединение СК-0944666, ослабляет стимулирующий эффект глутоксида на транспорт Na^{+} в эпителии кожи лягушки 55**Н.Е. Беликов, О.В. Демина, А.Ю. Лукин, С.Д. Варфоломеев, А.А. Ходонов**

Влияние солей металлов на оптические свойства нового фотохромного хелатофора 62

А.В. Бородина, К.А. Пименов, Ю.О. ВеляевОсобенности накопления некоторых липидов в тканях двусторчатого моллюска *Politapes aureus* (Gmelin, 1791) в сублитеральной зоне севастопольского побережья 71

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ**С.А. Пионтковский, А.В. Мельник, Т.Н. Климова, Е.Ю. Георгиева**

Характеристики планктонного сообщества крымского шельфа в период прохождения тепловых волн80

А.А. Барановский, А.В. Кузнецов

Анализ динамики экосистемы Чёрного моря на основе агентно-ориентированного моделирования.....86

CONTENTS

Volume 10, No. 1, 2025

GENERAL BIOPHYSICS

V.V. Roshchina, S.A. Bogun, A.A. Abushin

Application of spectral methods to search for azulene-containing plants in the arid zone 7

E.V. Shupova

Interaction of the antibiotic norfloxacin with polymeric DNA in the presence of proflavin.....15

MOLECULAR BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

H.A. Grebneva

Mechanism of rare tautomers formation of DNA bases when single-stranded DNA is irradiated with ultraviolet light.....24

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

Molecular modeling of conformational behavior and electronic structure of the antimicrobial tetrapeptide WRWR.....34

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, M.A. Beltov

Sigma-1 receptor agonist, compound (+) - SKF-10047, suppresses store-operated Ca^{2+} entry, induced by thapsigargin, in peritoneal macrophages..... 39

V.N. Lesnykh, A.V. Yelistatov, V.A. Kolombet

Program for processing the results of thought scanning using a chain verbal test.....46

A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, M.A. Beltov

Actin-related protein-2/3 (Arp2/3) complex inhibitor, compound CK-0944666, attenuates the stimulating effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin epithelium 55

N.E. Belikov, O.V. Demina, A.Yu. Lukin, S.D. Varfolomeev, A.A. Khodonov

Influence of metal salts on the optical properties of a new photochromic chelatophore.....62

A.V. Borodina, K.A. Pimenov, Yu.O. Velyaev

Features of lipid accumulation in the tissues of the bivalve mollusk *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) in the sublittoral zone of the Sevastopol coast71

BIOPHYSICAL ECOLOGY**S.A. Piontkovski, A.V. Melnik, T.N. Klimova, E.Yu. Georgieva**

Characteristics of the crimean shelf plankton community during a period of heat wave propagation.....80

A.A. Baranovsky, A.V. Kuznetsov

Analysis of the Black sea ecosystem stability based on agent-based modeling.....86

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ПОИСКА АЗУЛЕН-СОДЕРЖАЩИХ РАСТЕНИЙ АРИДНОЙ ЗОНЫ

Рощина В.В.¹, Богун С.А.², Абушин А.А.²

¹ Институт биофизики клетки РАН обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН
ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская область, 142290, РФ; e-mail: roshchinavic@mail.ru

² ФБГУН Государственный заповедник «Черные земли»
ул. Некрасова, 31, поселок Комсомольский, Черноземельский район, Республика Калмыкия, 359240, РФ;
e-mail: sergeibogun1984@yandex.ru, kalmykianbubo@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2025

Аннотация. Предложен новый подход к поиску синих пигментов азуленов в растениях аридной зоны с применением спектральных методов клеточного анализа. Микроспектрофотометрия и микроспектрофлуориметрия, позволили обнаружить синие пигменты азулены в интактных листьях растений аридной зоны Калмыкии: полыни песчаной *Artemisia arenaria* D.C., лерхи, полыни Лерха *Artemisia pauciflora* Web. (сем. Asteraceae), астрагала длиннолепесткового *Astragalus longipetalus* Chapt., астрагала длиннолистного *Astragalus subulatus* Pall. (сем. Fabaceae), ковыля Лессинга *Stipa lessingiana* Trin&Rupr. (сем. Poaceae), прангоса кормового *Prangos pabularia* Lindl. (сем. Umbelliferae), шалфея эфиопского *Salvia aethiopis* L. (сем. Lamiaceae), серпухи эруколистной *Serratula erucifolia* (L.) Boriss. (сем. Asteraceae), тюльпана южного *Tulipa australis* Link (*Tulipa sylvestris* Link. (Link) Pamp.), тюльпана Шренка *Tulipa suaveolens* (*Tulipa schrenkii*) Rott. (сем. Liliaceae), коровьяка фиолетового *Verbascum phoeniceum* L. (сем. Scrophulariaceae). Присутствие азуленов выявлялось по характерной голубой окраске поверхностей клеток и максимумов в области 580-640 нм в спектрах поглощения (абсорбции) и 405-430 нм в спектрах флуоресценции. Это было подтверждено в экспериментах с экстрактами этих гидрофобных пигментов растворителями: ацетоном или этанолом с поверхности листьев и изнутри. Полученные результаты могут представлять интерес для клеточного мониторинга азулен-содержащих растений и поиска видов, полезных для фармакологии.

Ключевые слова: абсорбция, азулены, голубая окраска, флуоресценция, спектры, экстракты из листьев.

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени единственным методом обнаружения и выделения азуленов была дистилляция эфирных масел, где продукт перегонки окрашивался в синий цвет из-за присутствия азуленов [1]. С 2022 года разрабатывается подход к обнаружению азуленов с помощью отбора растений с голубой или серебристой окраской листьев и их анализа спектральными методами [2,3]. При использовании такого подхода исследовано появление голубой или серебристой окраски у листьев ряда растений зоны умеренного климата [4], субтропической зоны России Кавказа [2] и сухих субтропиков Крыма [5] было обнаружено, что это может быть обусловлено присутствием синих пигментов азуленов. Эта проблема имеет значение как для экомониторинга этих соединений, так и анализа ресурсов природных источников азуленов, обладающих лечебными свойствами как антиоксиданты [7]. Предполагают [2,8], что эти природные соединения являются защитой растений от ультрафиолетовой радиации, тропосферного озона, и др. неблагоприятных факторов, приводящих к повреждениям образующимися активными формами кислорода.

Голубая или серебристая окраска листьев может быть или постоянной или заметной только в весенний период, как например у растений Приокско-Террасного заповедника [4]. Более того, эта тенденция особенно отмечена для видов засушливых районов и местностей с активной ультрафиолетовой инсоляцией, таких как субтропики Крыма [5] и Кавказа [2,6]. Для более подробного анализа этой связи важно было бы исследовать появление голубой окраски листьев растений в экстремальных условиях аридной зоны, например Калмыкии, где в весенний период очень высокий уровень ультрафиолетовой радиации, исключительно засушливый климат и засоленность почв Прикаспийской низменности [9,10]. Данные по азуленам для местных видов растений вообще отсутствуют, и была поставлена задача выяснить, есть ли эти пигменты у растений Калмыкии с применением спектральных методов. Ранее разработанный метод микроспектрофотометрии для анализа клеточных поверхностей [2,3] позволял это сделать сразу на интактных листьях. Для оценки в постоянных и незагрязненных территориях заповедника "Черные земли" как биосферной модели в рамках совместного исследования сотрудниками заповедника были взяты образцы растений с синей или серебристой окраской листьев. Спектральные и биохимические экспериментальные данные получали в лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки РАН.

МЕТОДЫ

Объекты. Объектами исследования служили целые листья с синей или серебристой окраской (рис. 1) полыни песчаной *Artemisia arenaria* D.C., лерхи, полыни Лерха *Artemisia pauciflora* Web. (сем. Asteraceae), астрагала длиннолепесткового *Astragalus longipetalus* Chapert., астрагала длиннолистного *Astragalus subulatus* Pall. (сем. Fabaceae), ковыля Лессинга *Stipa lessingiana* Trin&Rupr. (сем. Poaceae), прангоса кормового *Prangos pabularia* Lindl. (сем. Umbelliferae), шалфея эфиопского *Salvia aethiopis* L. (сем. Lamiaceae), серпухи эруколистной *Serratula erucifolia* (L.) Boriss (сем. Asteraceae), тюльпана южного *Tulipa australis* Link. (*Tulipa sylvestris* Link (Link) Pamp., тюльпана Шренка *Tulipa suaveolens* (*Tulipa schrenkii*) Rott. (сем. Liliaceae), коровьяка фиолетового *Verbascum phoeniceum* L. (сем. Scrophulariaceae), и экстракты из них.

Приготовление экстрактов из листьев. Анализ азученов проводили в экстрактах с поверхности целых листьев ацетоном или 95 % этанолом (1:10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 часа и более). Для выявления поверхностных пигментов использовали 10 минутные экстракты (смывы), а общее их содержание – в 24-часовых экстрактах (экстракты с поверхности и изнутри клеток).

Спектральные методы исследования клеток и экстрактов. Спектры поглощения клеток интактных листьев регистрировали [3,11] непосредственно на предметных стеклах с помощью микроспектрофотометра/микроспектрофлуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия). Фотографировали образцы с помощью люминесцентного микроскопа *Leica DM 6000 B*, вышеупомянутых конфокального микроскопа и микроспектрофотометра МСФ-15 с камерой *Levenhuk M300 Base* (Россия) и лазер-сканирующего конфокального микроскопа *Leica TCS SP-5* (Германия-Австрия-США). Спектры поглощения интактных листьев были представлены как первая производная спектров отражения по методу Золотарева для выявления небольших

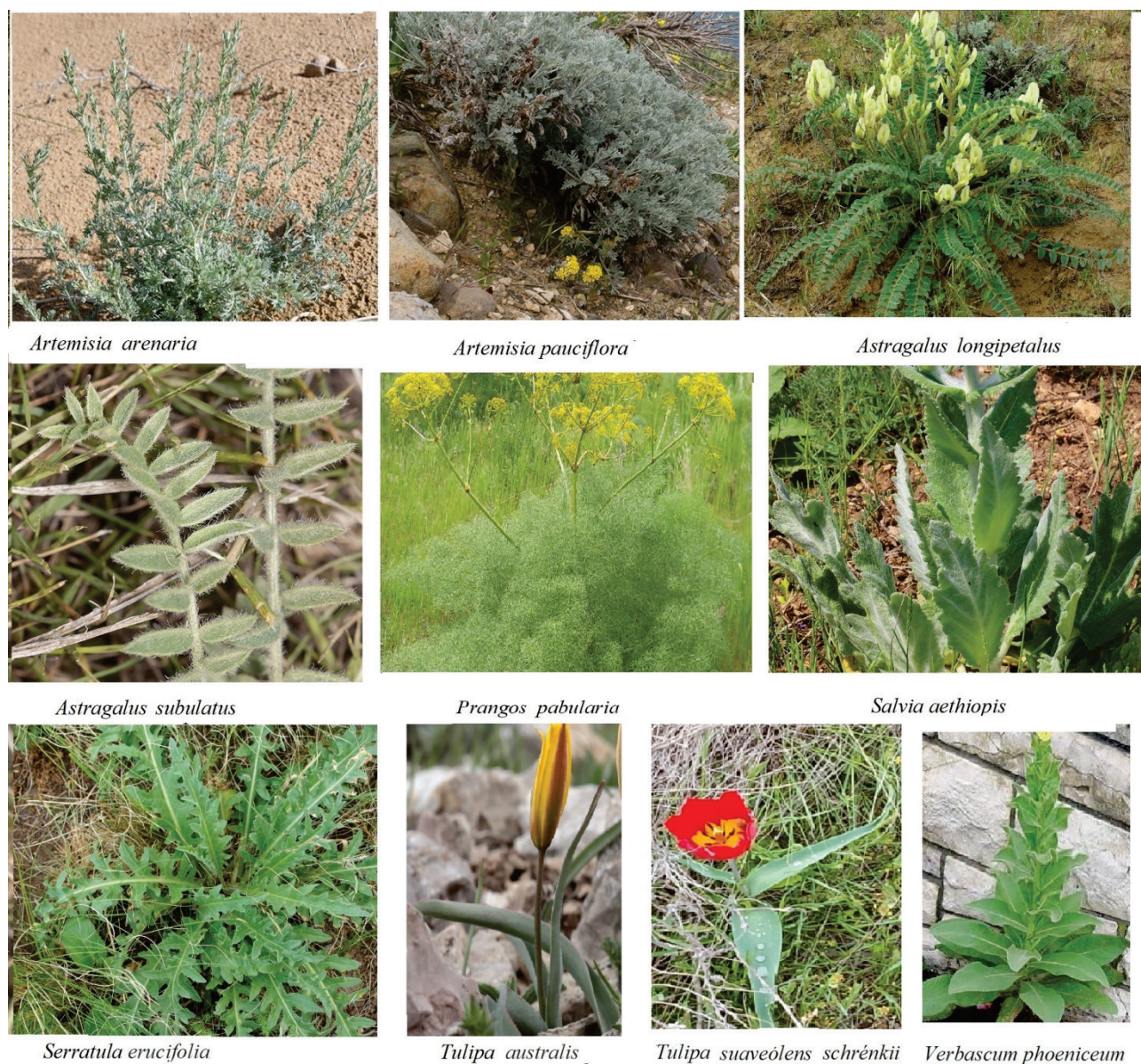


Рисунок 1. Различные оттенки голубых и серебристых листьев растений заповедника «Черные земли»

максимумов [12]. В микроспектрофотометре/микроспектрофлуориметре МСФ-15, где имеется опция дифференцирования для выявления максимумов в спектрах поглощения. Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов и экстрактов 95 % этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 часа и более) в 1-0,5 см-кюветах регистрировали с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Zess, Германия) и *Unicam Helios-epsilon* (США), а также спектрофлуориметра *Perkin Elmer 350 MPF-44 B* (Великобритания). Концентрацию азуленов определяли по спектрам поглощения экстрактов при 580 нм, как описано ранее [2,3].

Хроматография. Для выявления полос азуленов экстракты хроматографировали на бумаге Whatman № 1 без или после пропитки вазелиновым маслом или на тонкослойных пластинках силикагеля *Silufol*, как описано ранее [13,14]. Для больших проб листьев очистку азуленового экстракта от хлорофилла после добавления 50 % серной кислоты проводили на колонке силикагеля *Silikagel LS 5/40 Chemapol* (Chech. Resp) 10 x 2 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты проводили в следующей последовательности: 1. Сбор растений с голубой или серебристой окраской листьев и регистрация спектров поглощения интактной поверхности листьев; 2. Получение экстрактов ацетоном или этанолом с поверхности неповрежденных листьев в течение 10 минут (смывы с поверхности) и 24 часов (общая экстракция пигментов с поверхности и изнутри клеток); 3. Регистрация спектров поглощения экстрактов и определении концентраций азуленов.

Поверхность интактных клеток листьев. Получив фотографические изображения (рис. 1), дальнейший анализ поверхности листьев на присутствие азуленов включал спектральные исследования. Положение максимумов в спектрах поглощения интактных поверхностей клеток, зарегистрированных с помощью микроспектрофотометра МСФ-15, определяли согласно встроенной в программу прибора опции дифференцирования спектров отражения по Золотареву для полос малой интенсивности [12]. Как было описано ранее, и представлено в виде первой производной от спектра внешнего отражения в нашей предыдущей работе на примере поверхности ивы белой [2], верхняя часть графика первой производной с положительными значениями оптической плотности позволяет непосредственно определить положение максимума полосы поглощения. На рисунке 2 приводится пример таких исследований для листа полыни песчаной *Artemisia arenaria*. Нижняя часть графика с отрицательными значениями обычно не используется для анализа, ее в дальнейших графиках статьи удаляют (как будет показано на рисунке 3 для шалфея эфиопского *Salvia aethiopsis*). На рисунке 2 видны различия в спектрах поглощения между нижней и верхней сторонами листа. На верхней поверхности есть максимум 595- 600 нм в спектральной области, характерной для азуленов. Он значительно выше максимума хлорофилла при 666 нм. Внизу листа величина максимумов в этой области меньше чувствительности для данного прибора, где значимая величина оптической плотности в максимуме – не менее 0,05.

Для шалфея эфиопского (рис. 3) с помощью оптического зонда микроспектрофотометра (2 мкм) удалось снять спектры поглощения несекреторных клеток и секреторного волоска на поверхности как с верхней, так и нижней стороны листа. У первых типов клеток сверху на поверхности был зарегистрирован один максимум 589 нм, характерный для азуленов, тогда как на нижней поверхности – три: 580, 596 и 619 нм. Для секреторных клеток показаны пики 593 и 583 нм, соответственно с верхней и нижней поверхностей листа. Таким образом

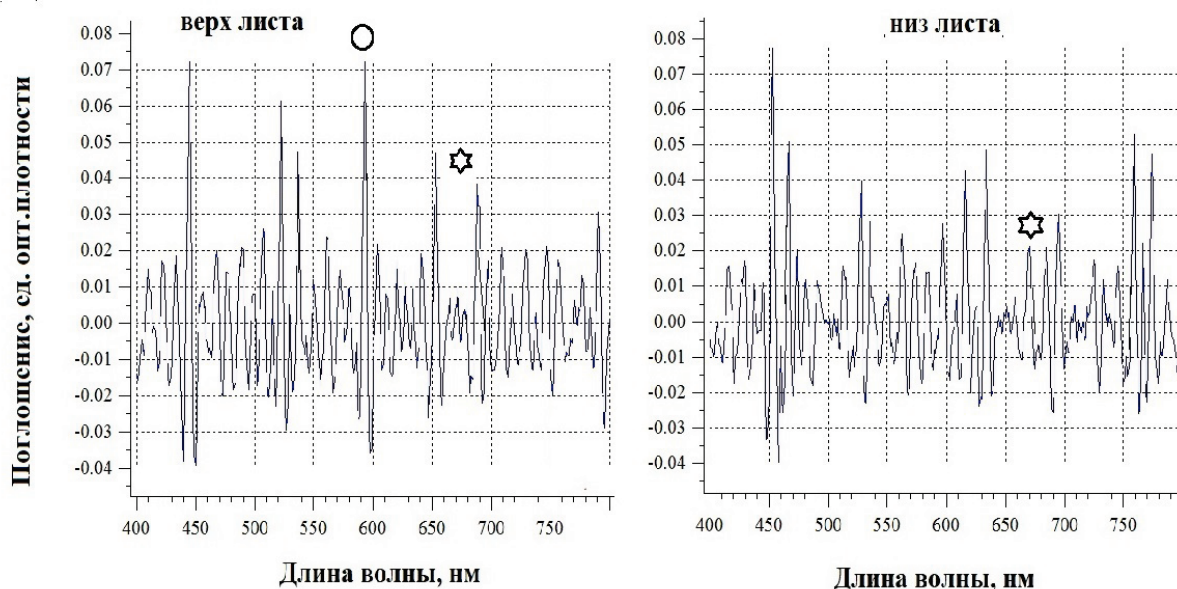


Рисунок 2. Спектр поглощения верхней и нижней поверхностей листа полыни песчаной *Artemisia arenaria* L в виде первой производной спектра отражения по Золотареву. Кружки – максимумы в области поглощения азуленов, звездочки – хлорофилла

возможно присутствие различных азуленов не только на поверхности несекреторных клеток, но и в секреторных волосках, расположенных на этой поверхности. Таким образом, получается, что содержащие эфирные масла секреторные волоски могут также хранить и даже синтезировать азулены. Это согласуется с данными о синтезе азуленов в процессе метаболизма эфирных масел у таких растений как тысячелистник обыкновенный и ромашки различных видов.

Подобные спектры поглощения были получены для всех взятых для исследования растений. В таблице 1 представлены данные о максимумах в спектрах поглощения всех исследованных видов.

Отметим также, что свойственные азуленам максимумы 595, 604, 610 нм есть (рис. 4) не только на обеих сторонах листа тюльпана Шренка *Tulipa shrenkii*, но и на верхней стороне лепестка цветка пик (на нижней нет). Лепесток же является видоизменением листа, и неслучайно, что небольшие концентрации азуленов (пик 615 нм) и хлорофилла здесь тоже присутствуют.

В таблице 1 представлены максимумы в спектрах поглощения листьев исследованных растений и их величины в единицах оптической плотности. Оказалось, что максимумы в спектрах поглощения часто отличаются на верхней и нижней стороне листа. Иногда на одной из сторон вообще отсутствуют характерные для этих синих пигментов. У *Prangos pabularia* нет максимумов азуленов на нижней стороне листа, а у *Serratula erucifolia* (L.) Boriss., напротив – на верхней.

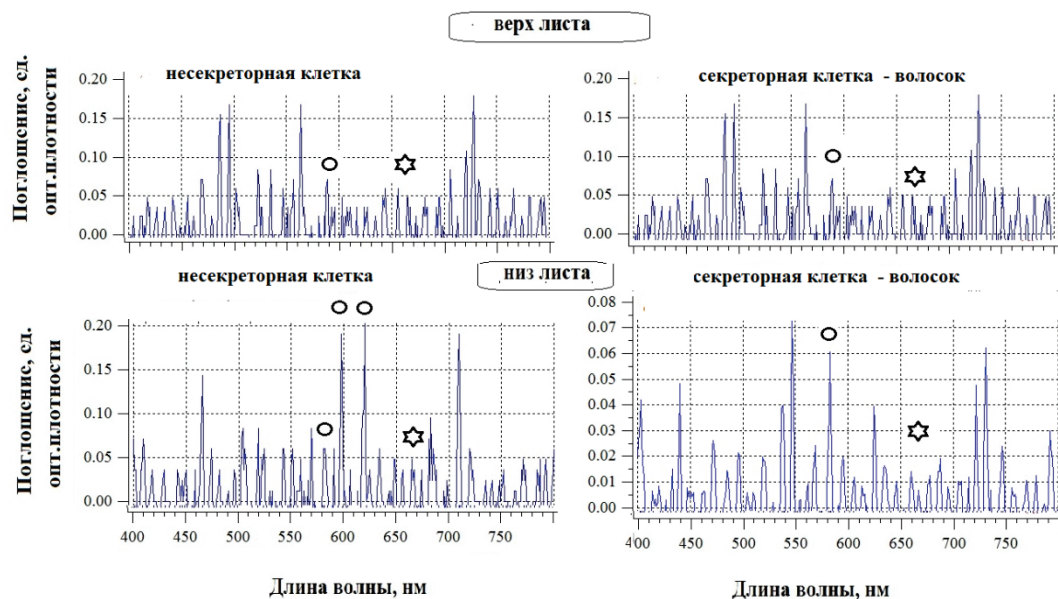


Рисунок 3. Спектры поглощения (первая производная спектров отражения по Золотареву [12]). Спектры поглощения поверхности листьев шалфея эфиопского. Круги — максимумы в области поглощения азуленов, звездочки — хлорофилла

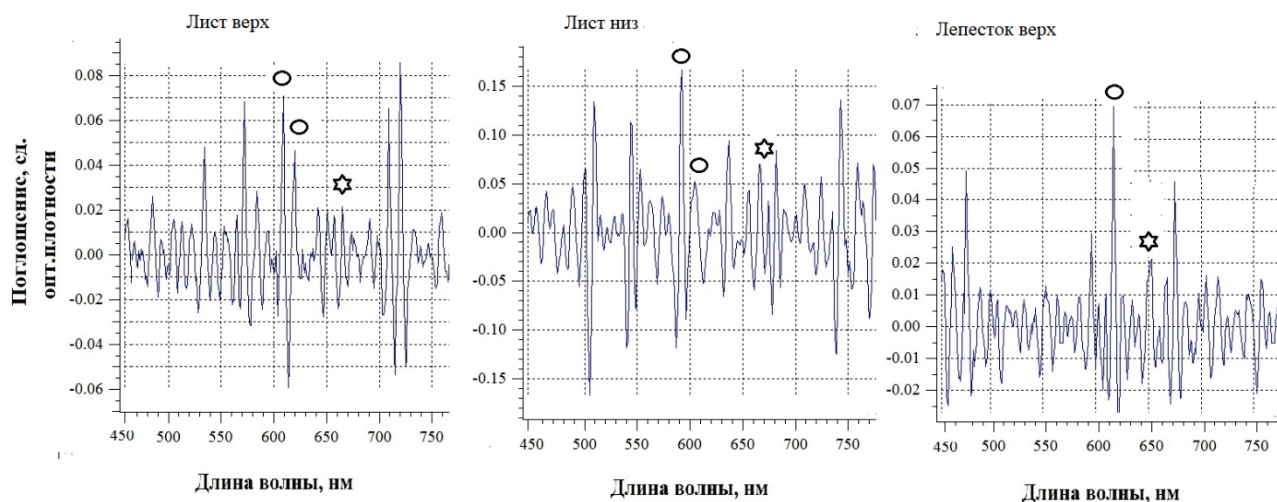


Рисунок 4. Спектры поглощения (первая производная спектров отражения) поверхности листа и лепестка цветка тюльпана Шренка *Tulipa suaveolens*. Круги — максимумы в области поглощения азуленов, звездочки — хлорофилла

Таблица 1. Спектральное исследование поглощения (абсорбции) целых листьев методом микроспектрофотометрии в области азуленов 570-640 нм. Жирным шрифтом достоверные величины для микроспектрофотометра из 4 повторностей относящиеся к возможным азуленам

Растение	Максимумы абсорбции, нм и в скобках величина пика, ед. опт. плотности		Растение	Максимумы абсорбции, нм и величина пика в ед. опт. плотности в скобках	
	Верх листа	Низ листа		Верх листа	Низ листа
<i>Artemisia arenaria</i>	593 (0,0751)	597 (0,0277)	<i>Serratula erucifolia</i>	Нет	594(00,0363)
<i>Artemisia pauciflora</i>	Нет	580 (0,0555)	<i>Stipa lessingiana</i>	600 (0,0316) 602 (0,0717)	597 (0,0499) 604 (0,0666)
<i>Astragalus longipetalus</i>	580 (0,0666)	598 (0,0145)	<i>Tulipa australis</i>	602 (0,0222)	623 (0,0666)
<i>Astragalus subulatus</i>	608 (0,0598) 622 (0,067)	595 (0,058) 610 (0,0714)	<i>Tulipa suaveolens</i> , <i>T. gesnirana</i> , <i>T. schrenkii</i>	586 (0,0448)	616 (0,0427)
<i>Prangos pabularia</i>	615 (0,0726)	Нет	<i>Verbascum phoeniceum</i>	592 (0,0670)	622 (0,058)
<i>Salvia aethiopis</i>	589 (0,0717) 623 (0,0487) Волосок 593 (0,0717)	580 (0,0510) 619 (0,0627) 623 (0,0487) Волосок 583 (0,0606)			

Спектральные исследования экстрактов листьев. На следующем этапе работы были исследованы экстракты из листьев органическими растворителями. Разное время экстракции из целых листьев – 10 минут и 24 часа [2,5] позволяет определить присутствие азуленов на поверхности и внутри клеток по спектрам поглощения (а) и флуоресценции (б). На рисунке 5а, 5б показан пример таких спектров для 10 минутного экстракта с поверхности листьев шалфея эфиопского. В спектре поглощения его есть небольшие максимумы 580 и 615 нм в области азуленов (показаны стрелками) и максимум хлорофилла 666 нм (отражает проникновение части растворителя внутрь клетки). Максимальная флуоресценция этого экстракта отмечена в области 400-460 нм, при этом небольшие максимумы 410 нм и 460 нм характерны для азуленов.

На рисунке 6 сопоставлены спектры поглощения этанольных 10 минутных и 24 часовых экстрактов из астрагала длиннолистного *Astragalus subulatus*. По данным вертикальной оси Y высота максимума 610 нм в области азуленов у первого образца примерно в четыре раза ниже, чем у второго (пики 580 и 615 нм).

По подобным измерениям величин оптической плотности в спектрах поглощения были определены концентрации азуленов для всех исследованных образцов (табл. 2).

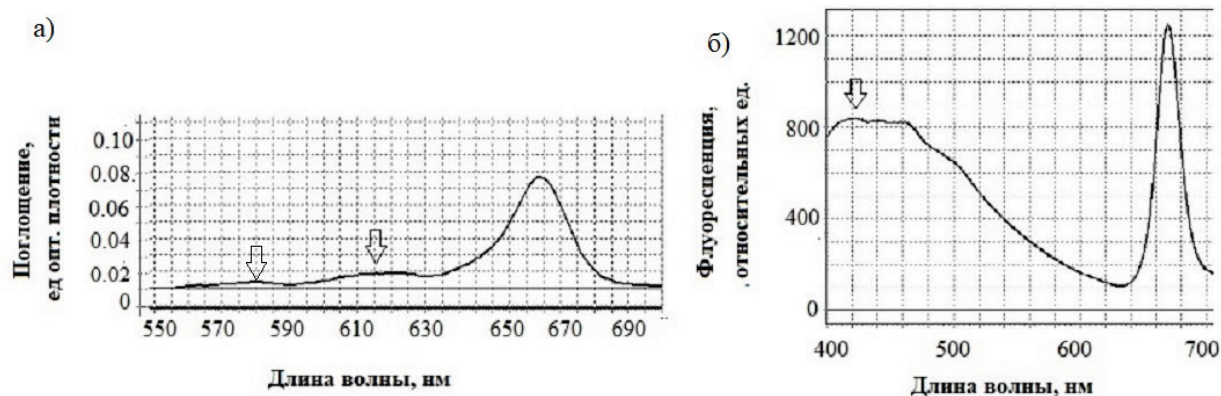


Рисунок 5. Спектры поглощения и флуоресценции 10 минутного экстракта этанолом с поверхности листа шалфея эфиопского *Salvia aethiopis*

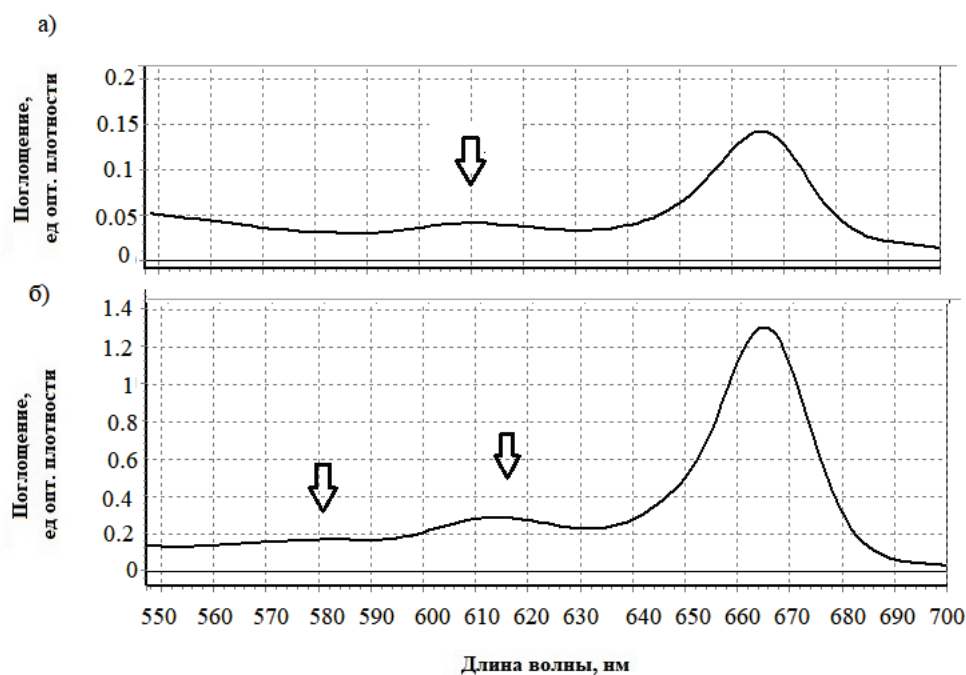


Рисунок 6. Спектры поглощения 10 минутного (а) и 24 часового (б) этанольных экстрактов астрагала длиннолистного *Astragalus subulatus*. Стрелками указаны максимумы, свойственные азуленам

Из данных таблицы 2 можно установить сколько азуленов локализовано на поверхности клеток (10 мин экстракт) и внутри их (путем вычитания данных 10 минутных экстрактов из общего количества азуленов за 24 часа экстракции). Оказалось, что только у серпухи *Serratula erucifolia* основная масса азуленов располагается на поверхности клеток листа, а внутри их в три раза меньше. Этот вид растений живет в крайне засушливых открытых местах и в районах солончаков [10,11], где солнечная активность характерна для пустынных районов. Для остальных видов количество голубых пигментов в листьях снаружи клеток и внутри может быть примерно равным, как у лерхи, полыни Лерха *Artemisia pauciflora* и астрагала длиннолепесткового *Astragalus longipetalus*. У остальных исследованных видов внутри клеток концентрация азуленов гораздо выше, чем снаружи: от 7-10 раз (*Stipa lessingiana*, *Astragalus subulatus*, *Salvia aethiopis*, *Tulipa suaveolens*, *schrénkii*) и до 20-100 раз (*Prangos pabularia*, *Tulipa suaveolens*, *schrénkii*, *Verbascum phoeniceum*).

Хроматографическая очистка от хлорофилла. Очистка от хлорофилла 24 часовых экстрактов была проведена сначала обработкой серной кислотой, затем растворения выпавшего осадка, который растворяли в этаноле, потом хроматографировали на колонке с силикагелем. Спектры поглощения очищенной синей фракции азуленов представлены на рисунке 7 для полыни песчаной *Artemisia aronaria* (а) и шалфея эфиопского *Salvia aethiopis* (б). Оба варианта показали характерный максимум 580 нм, свойственный азуленам.

Таблица 2. Концентрации азуленов по спектральным данным на поверхности клеток (10 мин экстракты-смывы с листьев ацетоном и этанолом) и внутри (24 часовые экстракты минус количество азуленов 10 мин экстрактов) из целых листьев

Растение	10 минутные экстракты	24 часовые экстракты (- 10 мин экстракт)	Растение	10 мин экстракты (- 10 мин экстракт)	24 часовые экстракты
<i>Artemisia arenaria</i>	117,5±14	587,0±37 (469,5)	<i>Serratula erucifolia</i>	65,8±5,8	82±4 (16,2)
<i>Artemisia pauciflora</i>	19,1±2,8	46,6±4,3 (27,5)	<i>Stipa lessingiana</i>	94,9±9,1	826,3±15,8 (731,4)
<i>Astragalus longipetalus</i>	84,5±8,3	169,0±12 (84,5)	<i>Tulipa australis</i>	48,2±7,4	482,3±3 (434,1)
<i>Astragalus subulatus</i>	26,4± 2,0	265,0±21,3 (238,6)	<i>Tulipa suaveolens, schrénkii</i>	5,2±1,1	535,9±28,4 (530,7)
<i>Prangos pabularia</i>	45,6±3,8	914,0±43 (868,4)	<i>Verbascum phoeniceum</i>	19,8±4,4	956,8±57 (937,0)
<i>Salvia aethiopis</i>	24,3±6,1	289,5±21,5 (265,2)			

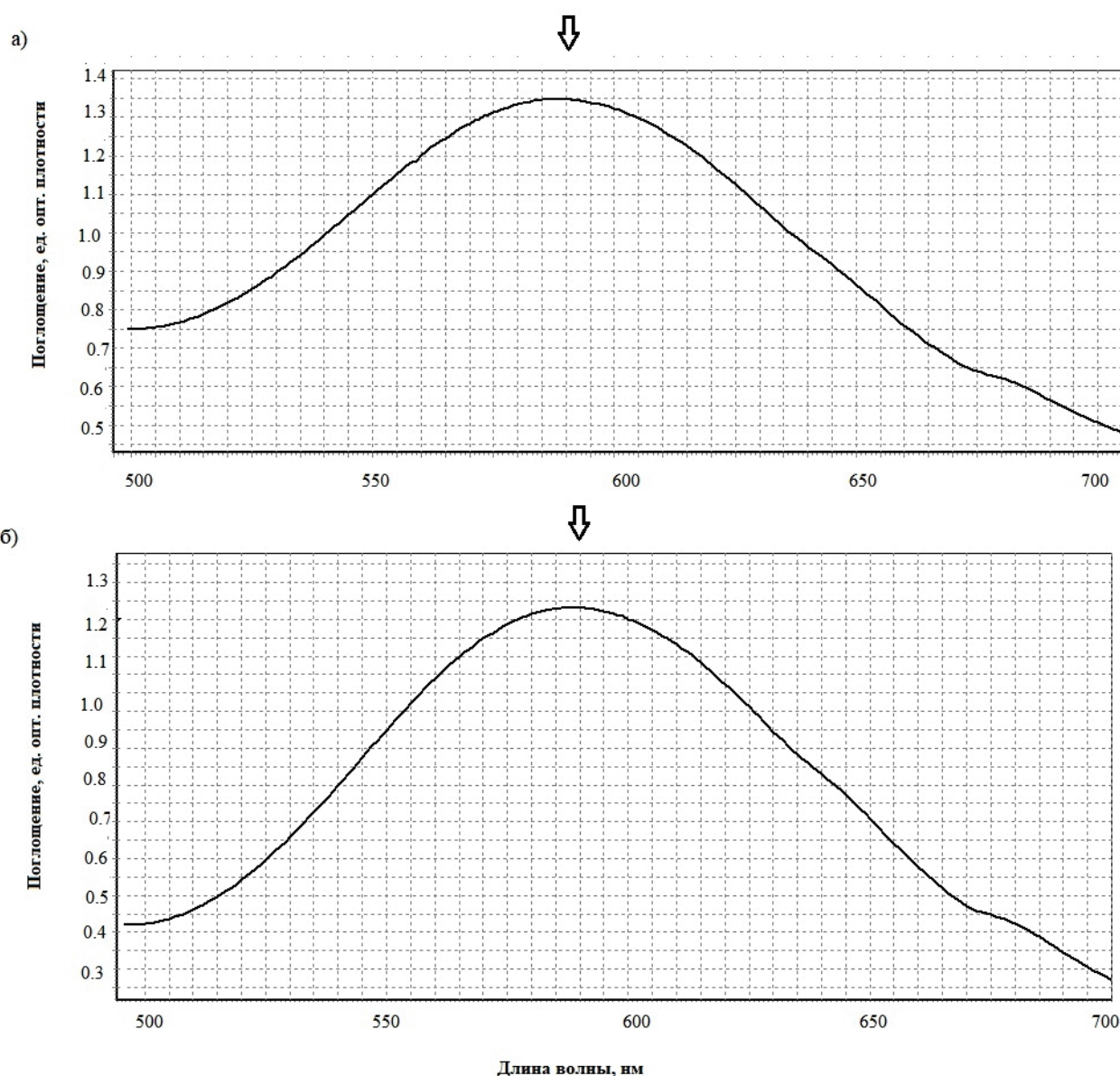


Рисунок 7. Спектры поглощения очищенной от хлорофилла фракции азуленов листьев полыни песчаной *Artemisia arenaria* (а) и шалфея эфиопского *Salvia ethiopsis* (б)

Таким образом, удалось показать, что собранные в конце марта- в середине апреля листья растений засушливой зоны Калмыкии (Заповедник «Черные земли»), имеющей в этот период по данным Национального управления по аэронавтике и исследованию космического пространства (NASA), высочайшее значение ультрафиолетовой радиации в Элисте от 3,92 до 4,83 кВт ч/м², содержат значительное количество азуленов в качестве защиты от образующихся активных форм кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью спектральных методов в листьях растений аридной зоны, зоны с высокой ультрафиолетовой радиацией, обнаружены пигменты азулены, являющиеся антиоксидантами. Это может быть частью механизма защиты поверхности и клеточного содержимого от активных форм кислорода в данной местности Калмыкии. Возможность выявлять с помощью микроспектрофотометрии в целых листьях максимумы азуленов в спектрах поглощения, представленных первой производной спектра отражения, открывает перспективы для практического поиска новых азулен-содержащих видов растений для применения их в медицине и фармакологии.

Список литературы / References:

1. Коновалов Д.А. Природные азулены. *Растительные ресурсы*, 1995, т. 31, № 1, с. 101-130 [Konovalov D.A. Natural azulenes. *Plant resources*, 1995, vol. 31, no. 1, pp. 101-130 (In Russ.)].
2. Рощина В.В., Яшин В.А., Кучин А.В., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биол. мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 54-62 [Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuchin A.V., Kunyev A.R., Soltani G.A.,

- Khaibulaeva L.M., Prizova N.K. The presence of azulenes on the surface of plant cells as a test for sensitivity to ozone. *Biol. membranes*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 54-62 (In Russ.).
3. Рощина В.В., Яшин В.А., Куньев А.Р. Исследование спектральных характеристик поверхности растительной клетки: присутствие азуленов и биогенных аминов. *Биол.мембраны*, 2023, т. 40, № 5, с. 351-361 [Roshchina V.V., Yashin V.A., Kunyev A.R. Study of spectral characteristics of the plant cell surface: presence of azulenes and biogenic amines. *Biol. membranes*, 2023, vol. 40, no. 5, pp. 351-361 (In Russ.).]
 4. Roshchina V.V., Shovkun M.M., Demidov V.E. Spectral search of azulene-containing plants of temperate climate as possible new biological resources for pharmacy. *J Med Plant Herbs*, 2024, vol. 3, № 3, pp. 1-14.
 5. Roshchina V.V., Kraynyuk E.S. Spectral studies for the search for azulene-containing plants in dry subtropics of the Crimea. *J. Plant. Biol. Agron.*, 2025, vol. 4, pp. 1-14.
 6. Roshchina V.V., Soltani G.A. Seasonal changes in azulenes in leaf cells of allelopathic species *Eucalyptus cinerea* studied by spectral methods. *Allelopathy J.*, 2025, vol. 66, № 1, pp. 1-12.
 7. Bakun P., Czarczynska-Goslinska B., Goslinski T., Lijewski S. *In vitro* and *in vivo* biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Med. Chem. Res.*, 2021, vol. 30, pp. 834-846, doi: 10.1007/s00044-021-02701.
 8. Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 36-39 [Roshchina V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. Leaf surface azulenes as a protective optical filter. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 36-39 (In Russ.).]
 9. Бакташева Н.М. *Флора Калмыкии и ее анализ*. Элиста: Джангар, 2000, 134 с. [Baktasheva N.M. *Flora of Kalmykia and its analysis*. Elista: Dzhangar, 2000, 134 p. (In Russ.).]
 10. Бананова В.А., Лазарева В.Г. *Атлас растений Северного-Западного Прикаспия*. Элиста: Джангар, 267 с. [Bananova V.A., Lazareva V.G. *Atlas of plants of the Northern-Western Caspian region*. Elista: Dzhangar, 267 p. (In Russ.).]
 11. Рощина В.В., Куньев А.Р., Фатерыга В.В., Шовкун М.М. Применение микроспектрофлуориметра /микроспектрофотометра для исследования поверхности растительных клеток. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 3, с. 137-142 [Roshchina V.V., Kunyev A.R., Fateriga V.V., Shovkun M.M. Application of a microspectrofluorimeter/microspectrophotometer for studying the surface of plant cells. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, vol. 8, no. 3, pp. 137-142 (In Russ.).]
 12. Золотарев В.М. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения. *Оптика и Спектроскопия*, 2012, т. 112, № 1, с. 150-154 [Zolotarev V.M. Application of differentiation in reflection spectroscopy. *Optics and Spectroscopy*, 2012, vol. 112, no. 1, pp. 150-154 (In Russ.).]
 13. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Спиридонов Н.А., Ковалева Л.В. Азулены – синие пигменты пыльцы. *Доклады РАН*, 1995, т. 340, № 5, с. 715-718 [Roshchina V.V., Melnikova E.V., Spiridonov N.A., Kovaleva L.V. Azulenes – blue pigments of pollen. *Reports of the Russian Academy of Sciences*, 1995, vol. 340, no. 5, pp. 715-718 (In Russ.).]
 14. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Яшин В.А., Карнауков В.Н. Автофлуоресценция интактных спор хвоща *Equisetum arvense* L. в процессе развития. *Биофизика*, 2002, т. 47, № 2, с. 318-324 [Roshchina V.V., Melnikova E.V., Yashin V.A., Karnaukhov V.N. Autofluorescence of intact spores of horsetail *Equisetum arvense* L. during development. *Biophysics*, 2002, vol. 47, no. 2, pp. 318-324 (In Russ.).]

APPLICATION OF SPECTRAL METHODS TO SEARCH FOR AZULENE-CONTAINING PLANTS IN THE ARID ZONE

Roshchina V.V.¹, Bogun S.A.², Abushin A.A.²

¹ Institute of Cell Biophysics of RAS, a separate unit of the PHC PNCBI RAS
Institutskaya str. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: roshchinavic@mail.ru

² Chernye Zemly State Nature Reserve
*Nekrasova str. 31, Komsomolsky settlement, Chernozyemelsky District, Republic of Kalmykia, 359240, Russia;
e-mail: sergeibogun1984@yandex.ru, kalmykianbubo@gmail.com*

Received 08.07.2025

Abstract. A new approach to the search for blue azulene pigments in plants of the arid zone using spectral methods of cell analysis is proposed. Microspectrophotometry and microspectrofluorometry made it possible to detect blue azulene pigments in intact leaves of plants of the arid zone of Kalmykia, sandy wormwood *Artemisia arenaria* D.C., lerhae, Lerhae wormwood *Artemisia pauciflora* Web (family Asteraceae), long-leaved astragalus *Astragalus longipetalus* Chapter., long-leaved astragalus *Astragalus subulatus* Pall. (family Fabaceae), Prangos forage *Prangos pabularia* Lindl. (family Umbelliferae), Ethiopian sage *Salvia aethiopis* L., serpuха erucifolia *Serratula erucifolia* (L.) Boriss., southern tulip *Tulipa australis* Link (Tulipa sylvestris Link.(Link) Pamp., Schrenk's tulip *Tulipa suaveolens* (Tulipa schrenkii) Rott., Purple mullein *Verbascum phoeniceum* L. The presence of azulenes was revealed by the characteristic blue coloration of cell surfaces and maxima in the 580-640 nm region in the absorption (absorption) spectra and 405-430 nm in the fluorescence spectra. This was confirmed in experiments with extracts of these hydrophobic pigments using acetone or ethanol solvents from the surface of leaves and from the inside. The results obtained may be of interest for cellular monitoring of azulene-containing plants and for the search for species useful for pharmacology.

Key words: absorption, azulenes, blue coloration, fluorescence, spectra, leaf extracts.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКА НОРФЛОКСАЦИНА С ПОЛИМЕРНОЙ ДНК В ПРИСУТСТВИИ ПРОФЛАВИНА

Шупова Е.В.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 18.07.2025

Аннотация. В последнее время наблюдается повышенный интерес к комплексному действию и совместным физико-химическим свойствам препаратов при их совместном применении. В данной работе это было исследовано на наиболее простых случаях ассоциации лигандов в водном растворе: профлавина и метиленового голубого с норфлоксацином, флавиномононуклеотидом и кофеином. Для исследований важно устанавливать такие параметры растворов, как константы комплексообразования и коэффициенты экстинкции. Для этого в ходе данной научной работы была написана и экспериментально верифицирована программа. Для понимания самого механизма комплексообразования важно использовать наилучшую модель, для выбора которой в настоящей работе представлено сравнение результатов аппроксимации и расчетных параметров по различным моделям, вычисленным написанной программой. Из приведенных выше результатов видно улучшение аппроксимации при использовании более сложной модели. Это дает возможность дальнейшего анализа с еще большим числом молекул в комплексах. Снятые спектры и рассчитанные в данной работе значения параметров для исследованных растворов могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях процессов комплексообразования веществ в растворах.

Ключевые слова: комплексообразование, лиганды, профлавин, норфлоксацин, спектроскопия, оптическая плотность.

В последнее время наблюдается повышенный интерес к комплексному действию и совместным физико-химическим свойствам препаратов при их совместном применении. Это может быть исследовано на более простых случаях типа ассоциации лигандов в водном растворе, например, профлавина и метиленового голубого с норфлоксацином, флавиномононуклеотидом, кофеином и ДНК. Для исследований важно устанавливать такие параметры растворов, как константы комплексообразования и коэффициенты экстинкции, например, с помощью спектрофотометрии. Для понимания самого механизма комплексообразования важно использовать наилучшую модель, для выбора которой были сопоставлены результаты расчетов по нескольким наиболее применяемым. Спектроскопия – раздел физики, посвященный изучению спектров электромагнитного излучения. Методы спектроскопии используются для исследования таких макроскопических свойств тел, как температура и плотность, а в аналитической химии – для обнаружения и определения веществ. К преимуществам спектроскопии относится возможность диагностики *in situ*, то есть непосредственно в «среде обитания» объекта, дистанционно, бесконтактно, без какой-либо специальной подготовки объекта. Поэтому она и получила широкое развитие и в настоящее время данный вид анализа широко распространен и находит свое применение во многих областях науки и техники [1-4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления двухкомпонентной раствора кофеин-метиленовый голубой необходимо получить концентрацию кофеина $C(\text{CAF})=120 \cdot 10^{-3}$ моль/л и метиленового голубого $C(\text{MB})=7,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Объем, необходимый для работы – 2 мл. Для снятия спектров двухкомпонентного раствора MB-CAF набирали в кювету спектрофотометра 2,0 мл полученного двухкомпонентного раствора (далее – смесь) и снимали его спектр. Далее производили разбавление раствора, забрав из кюветы 0,5 мл смеси и добавив 0,5 мл раствора MB. Получали смесь с прежней (рабочей) концентрацией MB и уменьшившейся концентрацией CAF. Далее проводили серию разбавлений-снятий спектров.

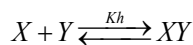
Аналогично для системы MB-NOR. Концентрация норфлоксацина: $C(\text{NOR})=5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Для снятия спектров раствора MB-FMN набирали в кювету спектрофотометра 2,0 мл полученного двухкомпонентного раствора с $C(\text{MB})=7,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л и $C(\text{NOR})=5 \cdot 10^{-3}$ моль/л и снимаем его спектр. Производили первое разбавление, забирая из кюветы 0,5 мл раствора и добавляя столько же раствора MB. Далее проводили серию разбавлений-снятий спектров.

Протокол приготовления трехкомпонентной системы PF-CAF-NOR. Молярные массы лигандов: $M(\text{PF})=245,71$; $M(\text{CAF})=194,19$ и $M(\text{NOR})=319,33$. Максимум поглощения профлавина (PF) – 444 нм, концентрация – $C(\text{PF})=10^{-5}$ моль/л. В программе спектрофотометра устанавливали диапазон длин волн, на которых необходимо снять спектр: $350 < \lambda < 520$ нм с шагом в 0,5 нм и временем экспозиции 30. Далее набирали в кювету спектрофотометра 2,0 мл рабочего трехкомпонентного раствора с $C(\text{PF})=10^{-5}$ моль/л, $C(\text{NOR})=10^{-3}$ моль/л и $C(\text{CAF})=120 \cdot 10^{-3}$ моль/л и снимаем его спектр. Производили первое разбавление, забирая из кюветы 0,5 мл

раствора и добавляя столько же двухкомпонентного раствора PF-NOR. Далее проводили серию разбавлений-снятий спектров. Все данные обрабатывали в программах [1,2].

В ходе выполнения эксперимента по трехкомпонентной системе PF-CAF-DNA взяли раствор PF с концентрацией $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Модели. Модель «1:1». Рассмотрим модель гетеро-димеров в модели «1:1», т.е. когда в растворе присутствуют только гетеродимеры XY [1,2,5,6]. Уравнение реакции:



Здесь X – цветное вещество, Y – бесцветное, K_h – равновесная константа. Закон сохранения массы (ЗСМ):

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + K_h x_1 y_1 \\ y_0 = y_1 + K_h x_1 y_1 \end{cases} \quad (1)$$

Оптическая плотность:

$$A = \varepsilon_m x_1 + \varepsilon_h K_h x_1 y_1, \quad (2)$$

Коэффициент молярной экстинкции мономера:

$$\varepsilon_m = \frac{A_0(\lambda_{\max})}{x_0}.$$

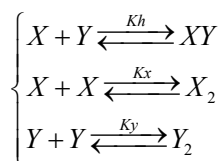
Решим систему (2) относительно концентраций мономеров x_1 и y_1 :

$$\begin{cases} x_1 = \frac{-b + \sqrt{b^2 + 4K_h x_0}}{2K_h} \\ y_1 = \frac{2K_h(y_0 - x_0) - b + \sqrt{b^2 + 4K_h x_0}}{2K_h} \end{cases} \quad (3)$$

Получили систему (3), представляющую ЗСМ для нашей системы. Перепишем оптическую плотность:

$$A = \varepsilon_h x_0 + (\varepsilon_m - \varepsilon_h) \frac{-(K_h y_0 - K_h x_0 + 1) + \sqrt{(K_h y_0 - K_h x_0 + 1)^2 + 4K_h x_0}}{2K_h}. \quad (4)$$

Модель XX-YY-XY. Для улучшения аппроксимации экспериментальной кривой, рассмотрим более сложную модель гетеро-димеров в системе: «XX-YY-XY». Предположим, что в растворе есть гетеродимеры YX и димеры обоих веществ X_2 и Y_2 [1,2,6]. Уравнение реакции:



Закон сохранения массы (ЗСМ):

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + K_x x_1^2 + K_h x_1 y_1 \\ y_0 = y_1 + K_y y_1^2 + K_h x_1 y_1 \end{cases} \quad (5)$$

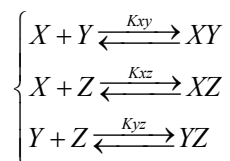
Оптическая плотность:

$$A = \varepsilon_m x_1 + \varepsilon_d K_x x_1^2 + \varepsilon_h K_h x_1 y_1. \quad (6)$$

Аналогично с ранними расчетами, преобразуем систему (5) относительно концентраций мономеров x_1 и y_1 . Тогда получаем систему, представляющую ЗСМ для нашей системы. Теперь возможен расчет оптической

плотности по формуле (6), подставив корни системы уравнений (5). Выполняли вычисления средствами языка программирования «R». Теперь возможно дальнейшее усложнение модели. Например, для расчета трехкомпонентных систем.

Модель «1:1:1». Перейдем к трехкомпонентным растворам. Для них рассмотрим простейший вариант гетеро-димеров в модели «1:1:1», т.е. когда в растворе присутствуют только гетеродимеры веществ X, Y, Z [2,5]. Уравнение реакции:



Здесь X – цветное вещество, Y и Z – бесцветные, K_{xy} , K_{xz} и K_{yz} – равновесные константы для соответствующих димеров. Закон сохранения массы (ЗСМ):

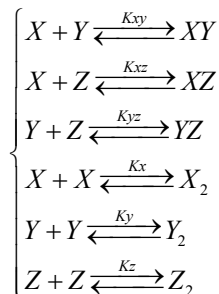
$$\begin{cases} x_0 = x_1 + K_{xy}x_1y_1 + K_{xz}x_1z_1 \\ y_0 = y_1 + K_{xy}x_1y_1 + K_{yz}y_1z_1 \\ z_0 = z_1 + K_{xz}x_1z_1 + K_{yz}y_1z_1 \end{cases} \quad (7)$$

Оптическая плотность:

$$A = \varepsilon_m x_1 + \varepsilon_{xy} K_{xy} x_1 y_1 + \varepsilon_{xz} K_{xz} x_1 z_1. \quad (8)$$

Решаем систему ЗСМ (7) относительно концентраций мономеров x_1 , y_1 , z_1 , аналогично двухкомпонентным системам.

Модель XX-YY-ZZ-XY-XZ-YZ. Для улучшения аппроксимации экспериментальной кривой, рассмотрим более сложную модель гетеро-димеров в двухкомпонентной системе: «XX-YY-ZZ-XY-XZ-YZ». Предположим, что в растворе есть не только гетеродимеры [2,5]. Уравнение реакции:



Закон сохранения массы (ЗСМ):

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + K_x x_1^2 + K_{xy} x_1 y_1 + K_{xz} x_1 z_1 \\ y_0 = y_1 + K_y y_1^2 + K_{xy} x_1 y_1 + K_{yz} y_1 z_1 \\ z_0 = z_1 + K_z z_1^2 + K_{xz} x_1 z_1 + K_{yz} y_1 z_1 \end{cases} \quad (9)$$

Оптическая плотность:

$$A = \varepsilon_m x_1 + \varepsilon_d K_x x_1^2 + \varepsilon_{xy} K_{xy} x_1 y_1 + \varepsilon_{xz} K_{xz} x_1 z_1. \quad (10)$$

Аналогично с ранними расчетами, преобразуем систему (9) относительно концентраций мономеров и получаем систему, представляющую ЗСМ для нашей системы. Теперь возможен расчет оптической плотности трехкомпонентной системы по формуле (10), подставив корни системы уравнений (9) [2,5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведя эксперимент по методике, описанной выше, получали спектры для трех- и двухкомпонентных систем: MB-CAF, MB-NOR, MB-FMN, PF-CAF, PF-NOR, PF-CAF-NOR, PF-ДНК и PF-CAF-ДНК. Каждый из них был обработан в программе, написанной средствами языка R. Обработка для каждой системы велась согласно двум моделям, описанным выше: «1:1» и «XX-XY-УУ» для двухкомпонентных и «1:1:1» и «XX-YY-ZZ-XY-XZ-YZ» для трехкомпонентных. Результатами являются кривые титрования и расчетные параметры, представленные ниже рисунками и таблицами соответственно.

Система MB-NOR. Данные эксперимента по системе MB-NOR представлены на рисунке 1. Входные параметры см. выше. После обработки полученных из эксперимента данных, получили теоретическую аппроксимационную кривую (рис. 1) и расчетные параметры раствора (табл. 1).

Система PF-CAF. Для начала проанализируем двухкомпонентную систему PF-CAF. Данные эксперимента представлены на рисунке 2.

Проводим расчет теоретической кривой (рис. 3). Параметры представлены в таблице 2.

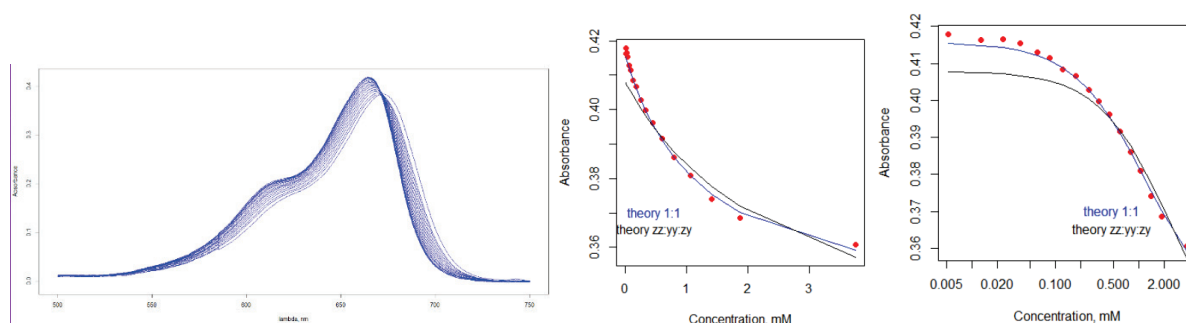


Рисунок 1. Оптическая плотность при разных концентрациях (слева) и кривые титрования в обычном и логарифмическом масштабе для системы MB-NOR

Таблица 1. Расчетные параметры для системы MB-NOR

Модель/параметр	1:1	XX-YY-XY
R^2	0,999	0,901
K_h	0,827	0,377
E_h	60,6	53,9

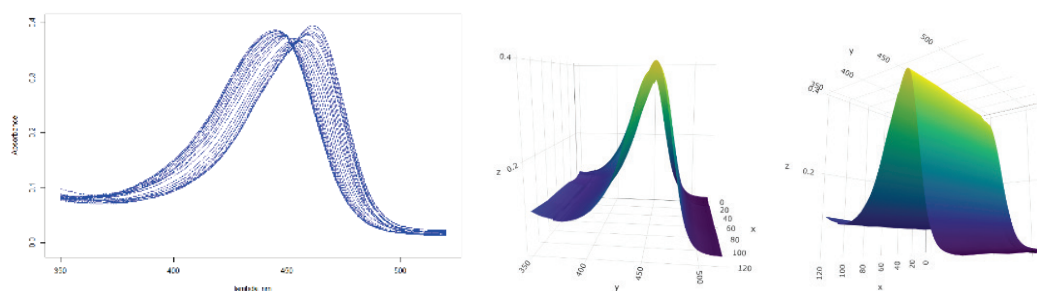


Рисунок 2. Двух- и трехмерный график оптической плотности в зависимости от концентрации CAF (ось x) и от длины волны (ось y) в двух ракурсах

Таблица 2. Рассчитанные параметры для PF-CAF

Модель/параметр	1-1	XX-YY-XY
R^2	0,967	0,974
K_h	0,185	0,198
E_h	30,3	28,6

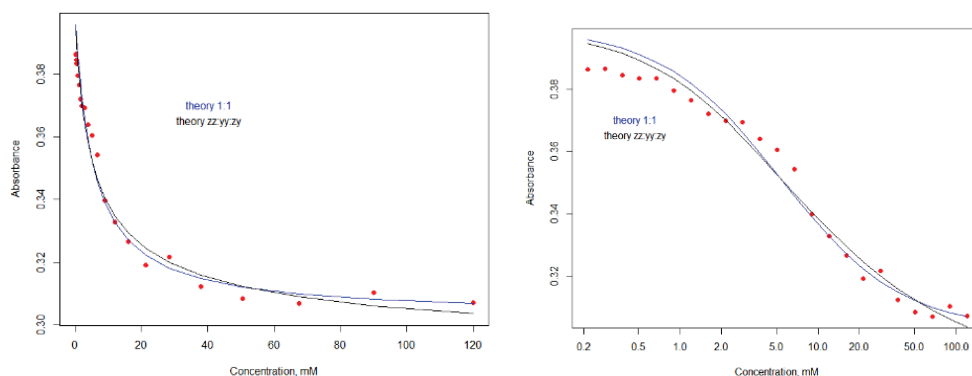


Рисунок 3. Графики в обычной и логарифмической шкалах теоретических аппроксимаций экспериментальной кривой при расчете по двум моделям

Система PF-NOR. Для начала проанализируем двухкомпонентную систему PF-NOR. Данные эксперимента представлены на рисунке 4.

Проводим расчет теоретической кривой (рис. 5). Параметры представлены в таблице 3.

Система PF-CAF-NOR. Для начала проанализируем трехкомпонентную систему PF-CAF-NOR. Данные эксперимента представлены на рисунке 6.

Находим в сохраненных данных значения оптической плотности, соответствующей $\lambda_{PF(max)}=444$ нм при всех концентрациях CAF и строим кривую титрования и проводим расчет теоретической кривой (рис. 7). Параметры представлены в таблице 4.

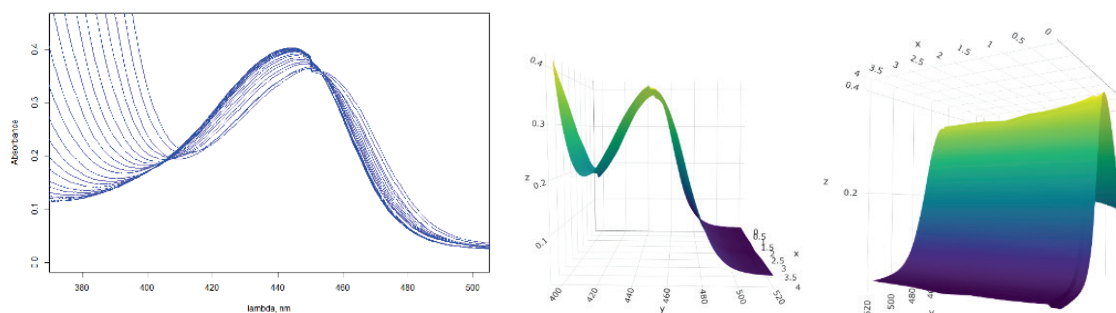


Рисунок 4. Двух- и трехмерный график оптической плотности в зависимости от концентрации NOR (ось x) и от длины волны (ось y) в двух ракурсах

Таблица 3. Рассчитанные параметры для PF-NOR

Модель/параметр	1-1	XX-YY-XY
R^2	0,968	0,961
K_h	0,262	0,167
E_h	29,6	23,7

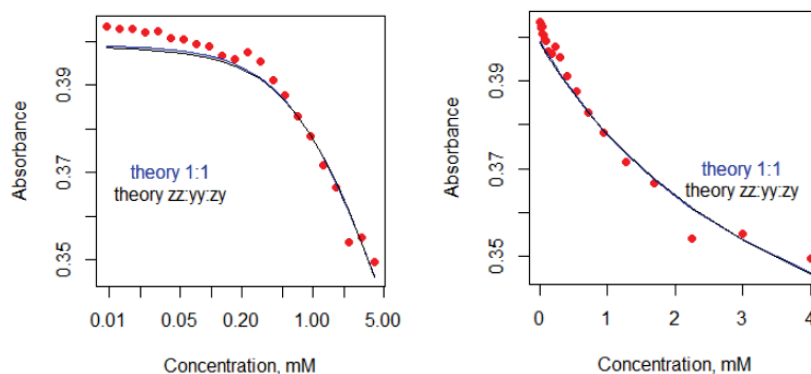


Рисунок 5. Графики в обычной и логарифмической шкалах теоретических аппроксимаций экспериментальной кривой при расчете по двум моделям

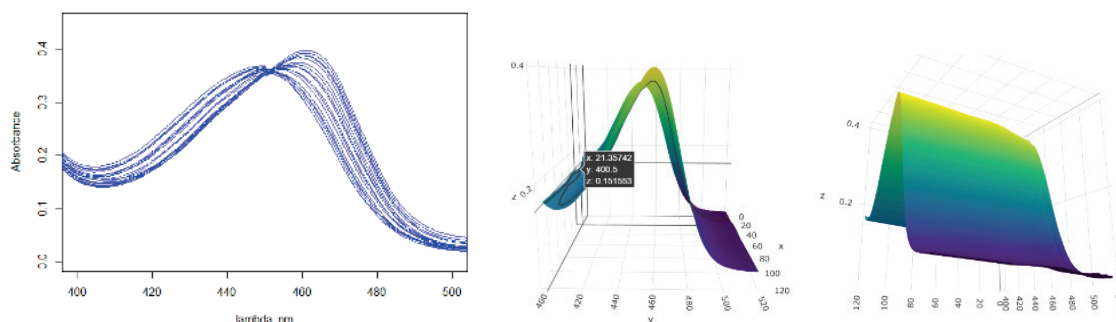


Рисунок 6. Трехмерный график оптической плотности в зависимости от концентрации CAF (ось x) и от длины волны (ось y) в двух ракурсах

Таблица 4. Рассчитанные параметры для PF-CAF-NOR

Модель/параметр	аналитика	1:1:1	XX-YY-ZZ-XY-XZ-YZ
R^2	0,931	0,761	0,923
K_{yz}	0,345	0,332	0,207
E_{yz}	0,00894	0,00548	0,00750

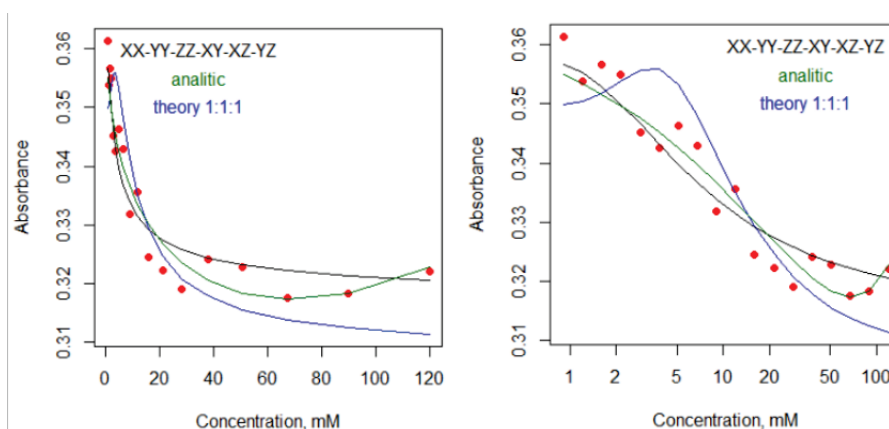


Рисунок 7. Графики в обычной и логарифмической шкалах теоретических аппроксимаций экспериментальной кривой при расчете по двум моделям

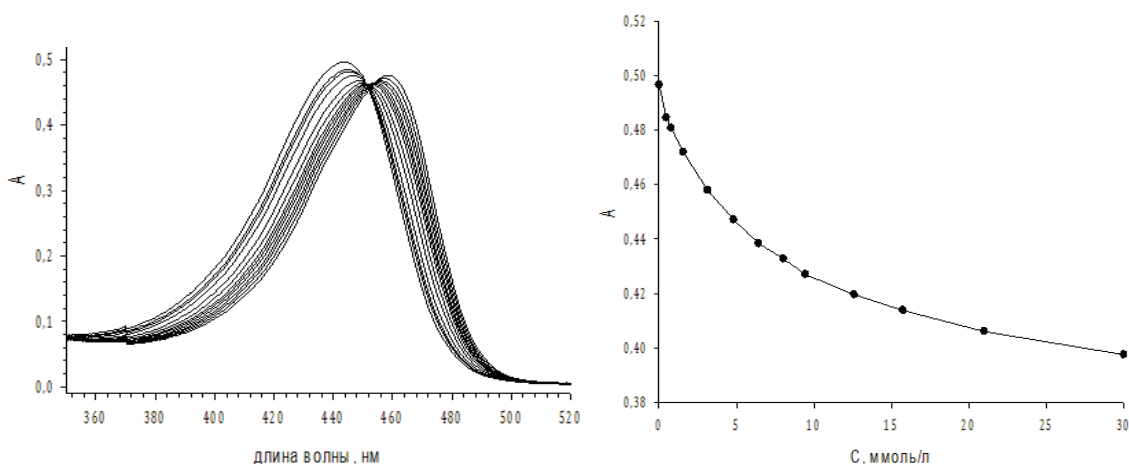


Рисунок 8. График зависимости оптической плотности от длины волны (слева) и кривая титрования (справа) для системы PF-CAF

Система PF-CAF-DNA. В результате эксперимента были получены данные по двухкомпонентным системам PF-CAF и PF-DNA и трехкомпонентной системе PF-CAF-DNA. В результате, для каждой из указанных систем были получены графики зависимости оптической плотности от длин волн и концентраций CAF, представленные на рисунках 8-10.

Далее проводили расчет теоретической кривой (рис. 11-13) для системы PF-CAF-ДНК. Параметры представлены в таблицах 5-7.

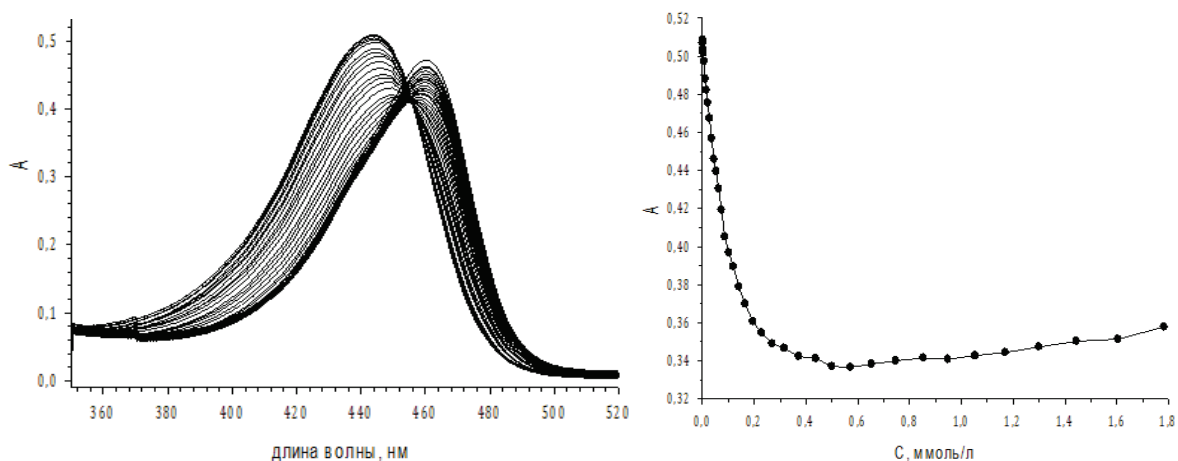


Рисунок 9. График зависимости оптической плотности от длины волны (слева) и кривая титрования (справа) для системы PF-ДНК

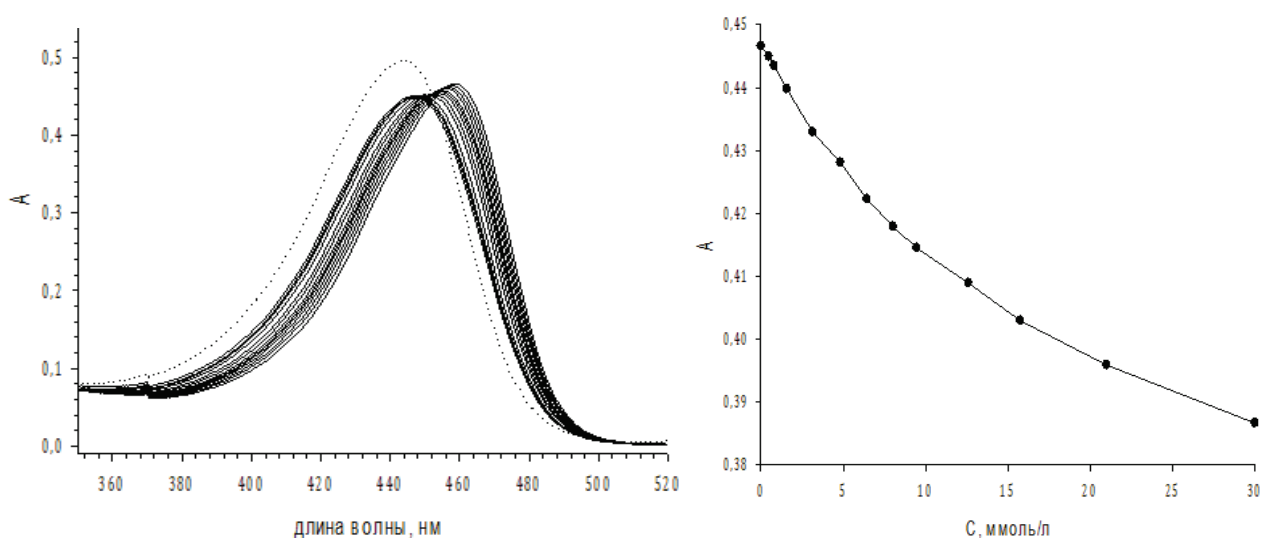


Рисунок 10. График зависимости оптической плотности от длины волны (слева) и кривая титрования (справа) для системы PF-CAF-ДНК

Таблица 5. Рассчитанные параметры для PF-CAF

Модель/параметр	1-1	XX-YY-XY
R^2	0,977	0,958
K_h	0,0359	0,0307
E_h	37,597	27,677

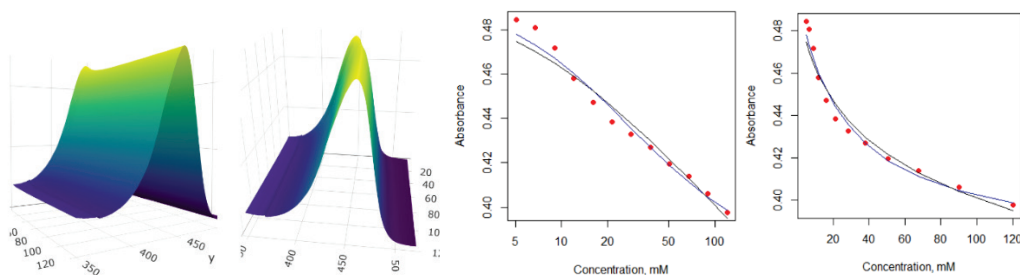


Рисунок 11. Трехмерный график оптической плотности в зависимости от концентрации CAF (ось x) и от длины волны (ось y) в двух ракурсах и графики в обычной и логарифмической шкалах теоретических аппроксимаций экспериментальной кривой при расчете по двум моделям системы для PF-CAF

Таблица 6. Рассчитанные параметры для PF-ДНК

Модель/параметр	1:1	XX-YY-XY
R^2	0,699	0,227
K_h	3,136	5,769
E_h	42,681	38,951

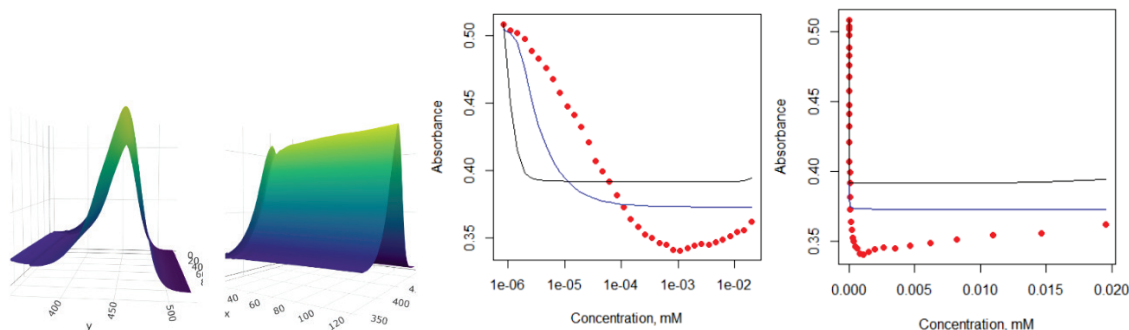


Рисунок 12. Трехмерный график оптической плотности в зависимости от концентрации CAF (ось x) и от длины волны (ось y) в двух ракурсах и графики в обычной и логарифмической шкалах теоретических аппроксимаций экспериментальной кривой при расчете по двум моделям для системы PF-ДНК

Таблица 7. Рассчитанные параметры для PF-CAF-ДНК

Модель/параметр	аналитика	1:1:1	XX-YY-ZZ-XY-XZ-YZ
R^2	0,918	0,090	0,246
K_{yz}	2,008	1,249	2,369
E_{yz}	0,000820	6,466	6,325

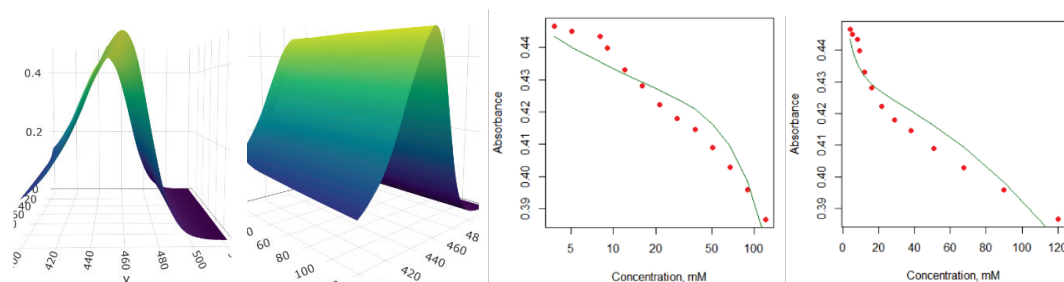


Рисунок 13. Трехмерный график оптической плотности в зависимости от концентрации CAF (ось x) и от длины волны (ось y) в двух ракурсах и графики в обычной и логарифмической шкалах теоретических аппроксимаций экспериментальной кривой для системы PF-CAF-ДНК

Из рисунка 13 видно, что наилучшие результаты для данной трехкомпонентной системы PF-CAF-ДНК дает первая модель, из использованных в расчетах. Более сложные же модели требуют дальнейшего усовершенствования.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования был получен массив данных, содержащий зависимости оптической плотности от длины волны и концентрации для двух- и трехкомпонентных растворов. Для расчета необходимых параметров данных систем (констант комплексообразования и коэффициента экстинкции) был разработан программный код на языке программирования R. В результате были получены константы комплексообразования и коэффициенты экстинкции для исследованных систем (MB-CAF, MB-NOR, MB-FMN, PF-CAF, PF-NOR, PF-CAF-NOR, PF-ДНК и PF-CAF-ДНК) путем их расчета в разработанных скриптах. В настоящей работе представлено сравнение результатов аппроксимации и расчетных параметров по различным моделям. Из приведенных выше результатов видно улучшение аппроксимации при использовании более сложной модели (за исключением последней системы PF-CAF-ДНК). Это свидетельствует о том, что в следует рассчитывать димеризацию всех вариантов, а не ограничиваться гетеродимерами.

Список литературы / References:

1. Evstigneev M.P., Evstigneev V.P., Hernandez Santiago A.A., Davies D.B. *Effect of a mixture of caffeine and nicotinamide on the solubility of vitamin (B2) in aqueous solution*. Eur. J. Pharm. Sci., 2006, vol. 28, pp. 59-66.

2. Бучельников А.С., Евстигнеев М.П. *Физика биополимеров*. Методические указания к циклу практических занятий по дисциплине «Физика биополимеров» для студентов направления 6.040203 «Физика» дневной формы обучения. Севастополь: Издательство СевНТУ, 2013, 60 с. [Buchelnikov A.S., Evstigneev M.P. *Physics of Biopolymers*. Guidelines for a series of practical classes on the subject "Physics of Biopolymers" for students majoring in 6.040203 "Physics" in full-time education. Sevastopol: SevNTU, 2013, 60 p. (In Russ.)].
3. Prylutsky Y., Buchelnikov A., Voronin D., Kostjukov V., Ritter U., Parkinson J., Evstigneev M. C₆₀ fullerene aggregation in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, vol. 15, pp. 9351-9360.
4. Kirchhoff G., Bunsen R. *Chemical Analysis by Observation of Spectra*. Engl. translation from *Annalen der Physik und der Chemie* (Poggendorff), vol. 110, p. 1860.
5. Phan A.T., Kuryavii V., Gaw H.Y., Patel D.J. *Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter*. *Nat. Chem. Biol.*, 2005, vol. 1, pp. 167-173.
6. Gatasheh A., Mansour K., Kannan S., Hemalatha K., Imrana N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. *Karbala International Journal of Modern Science*, 2017, vol. 3, pp. 272-278.

INTERACTION OF THE ANTIBIOTIC NORFLOXACIN WITH POLYMERIC DNA IN THE PRESENCE OF PROFLAVIN

Shupova E.V.

Sevastopol State University

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

Received 18.07.2025

Abstract. Recently, there has been an increased interest in the complex action and joint physical and chemical properties of drugs when they are used together. In this paper, this was investigated in the simplest cases of ligand association in an aqueous solution: proflavin and methylene blue with norfloxacin, flavin mononucleotide and caffeine. For research, it is important to establish such parameters of solutions as complexation constants and extinction coefficients. For this purpose, the program was written and experimentally verified in the course of this scientific work. To understand the mechanism of complexation itself, it is important to use the best model, for the selection of which in this paper we present a comparison of approximation results and calculated parameters for various models calculated by the written program. The results shown above show an improvement in the approximation when using a more complex model. This allows further analysis with even more molecules in the complexes. The spectra taken and the parameter values calculated in this paper for the studied solutions can be used in further scientific research of the processes of complexation of substances in solutions.

Key words: complexation, ligands, proflavin, norfloxacin, spectroscopy, optical density.

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ РЕДКИХ ТАУТОМЕРОВ ОСНОВАНИЙ ДНК ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ СВЕТОМ

Гребнева Е.А.

Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина
ул. Р. Люксембург, 72, Донецк, 83114, РФ; e-mail: grebneva@gmail.com

Поступила в редакцию 14.06.2025

Аннотация. Для того, чтобы предсказать скорость образования мутаций в различных вирусах, необходимо разработать механизмы образования мутаций в одноцепочечных ДНК и РНК, и в двухцепочечных РНК и ДНК. Для построения полимеразно-таутомерных моделей ультрафиолетового мутагенеза вирусов в первую очередь необходимо найти редкие таутомеры оснований ДНК и РНК, образующиеся при облучении молекул одноцепочечных и двухцепочечных ДНК и РНК ультрафиолетовым светом. В настоящей работе показано, что механизм образования редких таутомеров оснований одноцепочечной РНК, образующихся при облучении их ультрафиолетовым светом, справедлив и при образовании редких таутомеров оснований одноцепочечной ДНК. Одноцепочечная ДНК находится в водной среде. При этом молекулы воды присоединяются к молекуле ДНК с помощью водородных связей. Возможны три канала релаксации электронно-колебательных состояний. Образование редких таутомерных форм оснований ДНК происходит при безызлучательной релаксации энергии возбуждения. Это приводит к сильным вынужденным колебаниям длин водородных связей и изменению таутомерных состояний оснований ДНК. При облучении одноцепочечной ДНК, связанной с молекулами воды водородными связями, могут образовываться все возможные таутомерные формы цитозина, гуанина, тимина и аденина, которые способны влиять на характер спаривания оснований. Показано, что возможно образование 7 редких таутомерных форм цитозина, гуанина, тимина и аденина, таких, которые способны влиять на характер спаривания оснований. Такие редкие таутомеры будут стабильными в одноцепочечной ДНК, находящейся в водной среде.

Ключевые слова: ультрафиолетовый мутагенез, мутагенез вирусов, редкие таутомеры цитозина, редкие таутомеры гуанина, редкие таутомеры тимина, редкие таутомеры аденина, одноцепочечная ДНК.

Генетический материал вирусов может представлять собой, в частности, одноцепочечные молекулы ДНК [1,2]. Вирус SARS-CoV-2 [3,4] вызвал пандемию COVID-19. Высокая скорость образования мутаций [5,6] привела к превращению COVID-19 в сезонное респираторное заболевание, наряду с ОРВИ и гриппом и, скорее всего, останется с нами навсегда. Мутации в вирусе SARS-CoV-2 появлялись так быстро, что вакцины к конкретным штаммам быстро устаревали и становились неэффективными к следующим штаммам. В тоже время вирус гриппа характеризуется низкой скоростью образования мутаций и за десятки лет образовалось всего несколько штаммов вируса гриппа. Поэтому вакцины к конкретным штаммам вируса гриппа остаются эффективными. В случае возникновения новой эпидемии, вызванной вирусами, было бы исключительно полезно заранее знать, будет ли данный вирус характеризоваться высокой или низкой скоростью образования мутаций. Как видно из сравнения коронавируса и вируса гриппа, для эффективной профилактики распространения вирусного заболевания требуются разные методы. Например, вакцинирование будет эффективно только для вирусов с низкой скоростью образования мутаций. Для того, чтобы предсказать, будет ли данный вирус характеризоваться высокой или низкой скоростью образования мутаций, надо изучить особенности мутагенеза в различных вирусах. А именно, в вирусах, содержащих одноцепочечные ДНК и РНК, а также двухцепочечные ДНК и РНК.

Общепринятая полимеразная модель мутагенеза [7-8] противоречит экспериментальным данным [9,10]. Уотсон и Крик предложили таутомерную модель [11]. В дальнейшем участие редких таутомерных форм в мутагенезе использовалось для объяснения спонтанного мутагенеза [12]. Однако, модели мутагенеза, опирающиеся на гипотезу о редких таутомерных формах, являются чисто физико-химическими, они игнорируют тот факт, что синтез ДНК происходит с участием различных ферментов. Существует еще одна гипотеза о природе мутагенеза, которая заключается в том, что индуцированные ультрафиолетовым светом мутации происходят только после дезаминирования цитозина или 5-метилцитозина внутри циклобутанового пиримидинового димера [13]. Однако, как показывают экспериментальные данные, скорость дезаминирования слишком низка, чтобы вносить значительный вклад в мутагенез в *Escherichia coli* [14].

Мной были предложены полимеразно-таутомерные модели ультрафиолетового мутагенеза [15-42], опирающиеся на гипотезу Уотсона и Крика [11]. Мной был разработан механизм образования редких таутомеров оснований ДНК при облучении двухцепочечной молекулы ДНК ультрафиолетовым светом [15,27,31]. Экспериментальные данные [9,10] подтверждают полимеразно-таутомерные модели ультрафиолетового мутагенеза [15-39,42].

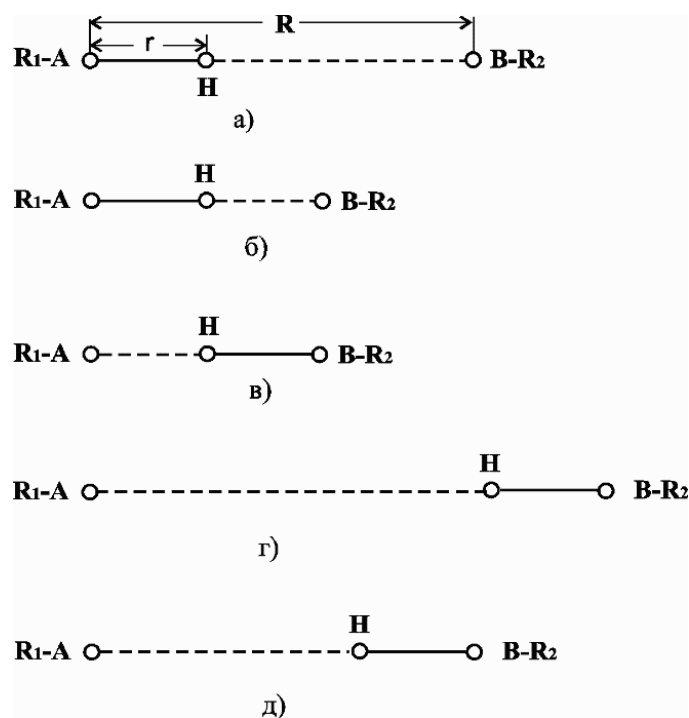


Рисунок 1. Схематическое изображение динамики водородной связи между молекулами оснований одноцепочечной ДНК и молекулами воды, приводящей к образованию новых таутомеров оснований одноцепочечной ДНК: R – длина водородной связи; r – расстояние от атома А до атома водорода; А – атом, входящий в состав оснований одноцепочечной ДНК, связанный водородной связью с молекулой воды; В – второй атом, входящий в состав молекулы воды, связанный водородной связью с основанием одноцепочечной ДНК; R_1 – радикал, входящий в состав оснований одноцепочечной ДНК; R_2 – второй радикал, входящий в состав молекулы воды; Н – атом водорода. Атомы и радикалы для всех трех водородных связей между молекулами оснований одноцепочечной ДНК показаны на рисунках 2-5

Полимеразно-таутомерные модели ультрафиолетового мутагенеза [15-39,42] разработаны только для двухцепочечной ДНК. В [40,41] был разработан механизм образования редких таутомеров в основаниях РНК при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом. Было показано, что при этом возможно образование семи стабильных редких таутомеров урацила и аденина [40] и семи стабильных редких таутомеров цитозина и гуанина [41], способные влиять на характер спаривания оснований. Для построения полимеразно-таутомерных моделей мутагенеза вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК необходимо найти редкие таутомеры, способные влиять на характер спаривания оснований, в одноцепочечной ДНК. В данной работе планируется показать, что механизм образования редких таутомеров, разработанный для одноцепочечных РНК, справедлив и для одноцепочечных ДНК и найти редкие таутомеры оснований ДНК, способные влиять на характер спаривания оснований, образующиеся при облучении одноцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом.

Механизм образования редких таутомеров оснований одноцепочечной ДНК, при облучении одноцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом. В [40,41] мной был разработан механизм образования редких таутомеров в основаниях РНК при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом. Легко показать, что механизм образования редких таутомеров оснований одноцепочечной РНК [40,41] справедлив и для одноцепочечной ДНК. Одноцепочечные РНК и одноцепочечные ДНК различаются только тем, что молекулы РНК содержат молекулы урацила, а молекулы ДНК содержат молекулы тимина. Кроме того, у них немного различаются сахаро-фосфатные остовы.

Принципиальная разница между редкими основаниями двухцепочечной ДНК и одноцепочечной ДНК заключается в том, что редкие таутомеры одноцепочечной ДНК стабильны всегда, а редкие таутомеры двухцепочечной ДНК стабильны только при определенных условиях. А именно, они стабильны только тогда, когда входят в состав *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров или находятся в небольшой окрестности от них. Это происходит, потому что напротив циклобутановых пиримидиновых димеров нить ДНК искривляется и водородные связи между основаниями удлиняются или даже рвутся [43-46].

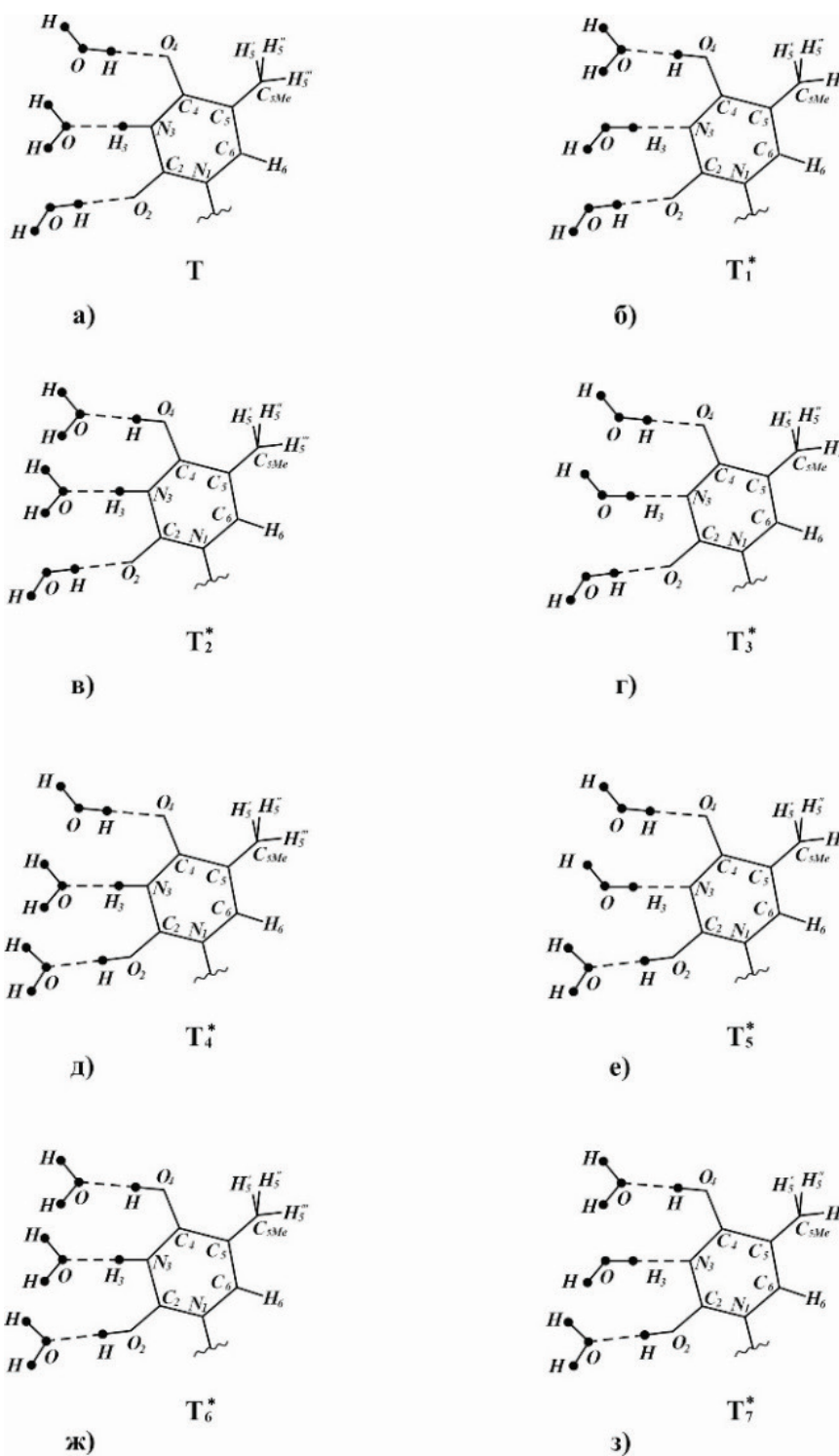


Рисунок 2. Редкие таутомеры тимина, которые могут образовываться в одноцепочечной ДНК, находящейся в водной среде

Главная причина образования редких таутомеров оснований одноцепочечных ДНК – сильные вынужденные колебания. Точно так же, как было показано для двухцепочечных ДНК и для одноцепочечных РНК, энергия ультрафиолетового света, в конечном счете, локализуется на одном из оснований, приводя к возбуждению электронно-колебательных состояний [47]. Релаксация с синглетного электронного уровня [48] не может приводить к повреждению молекул ДНК или РНК. К повреждению молекул ДНК или РНК может приводить только безызлучательная релаксация, когда в объеме нескольких оснований ДНК или РНК [49,50] произойдет возбуждение нормальных колебаний оснований ДНК и за 10^{-14} - 10^{-12} сек. [51,52] основания ДНК перейдут в равновесное состояние. В результате водородных связей могут уменьшиться и протонный потенциал превратится в одноямный [52-55].

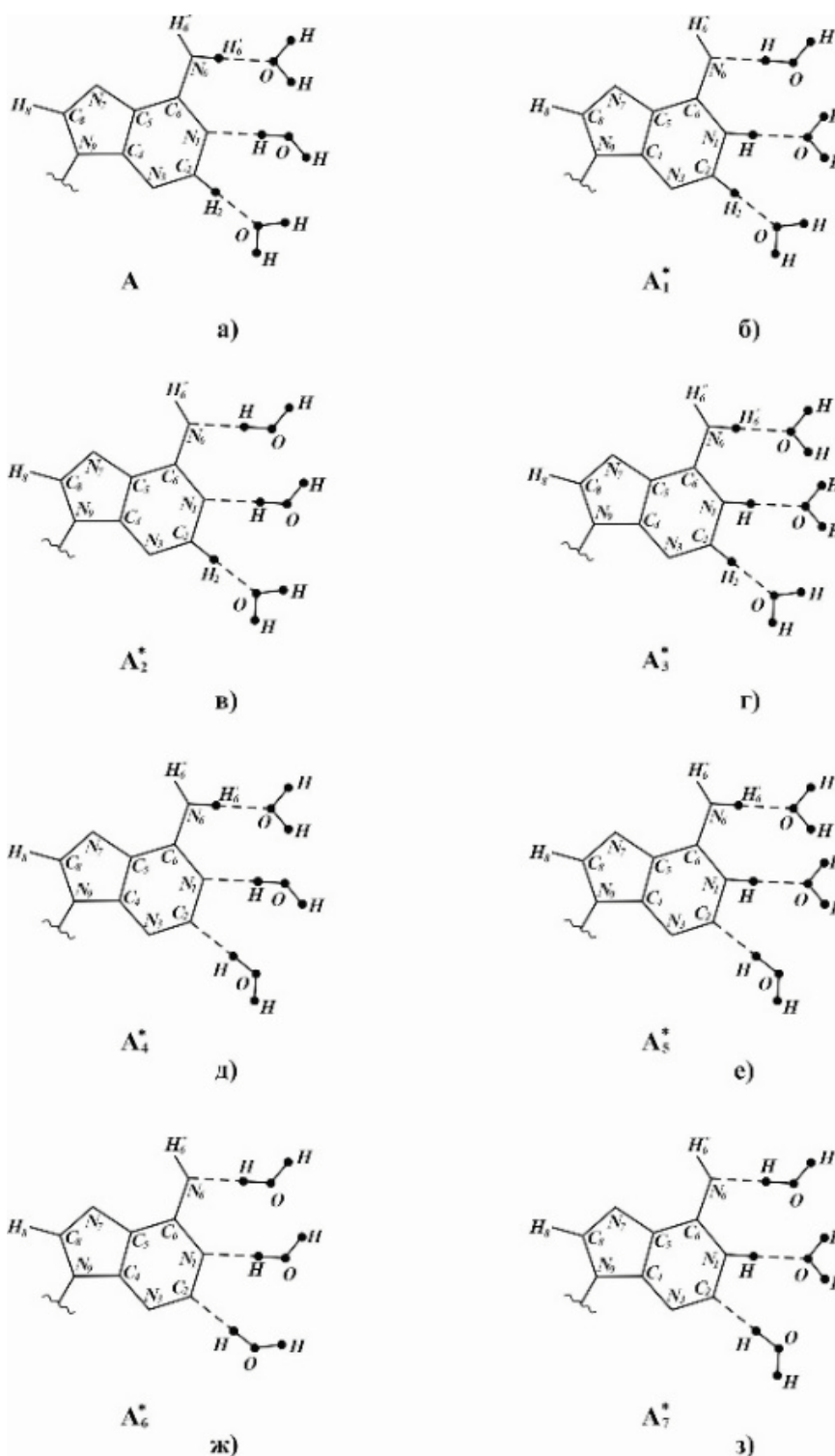


Рисунок 3. Редкие таутомеры аденина, которые могут образовываться в одноцепочечной ДНК, находящейся в водной среде

В водородных связях между основаниями ДНК и молекулами воды атом водорода образует валентную связь с одним из атомов – партнеров по водородной связи (рис. 1а) [56]. При изменении длины водородной связи расстояние от атома водорода до второго атома – партнера по водородной связи сильно изменяется [55]. Когда атом водорода займет положение почти в центре водородной связи, атом водорода образует сильную связь с с основанием ДНК или РНК, и с молекулой воды (рис. 1в). Поэтому, при удлинении водородной связи атом водорода может остаться связанным с другой молекулой – партнером по водородной связи (рис. 1д) [55], особенно при возбуждении водородной связи [57]. Сравнение времен жизни, полученных в работах [48], [58] и [52,54], а также результаты работы [59], показывает, что эти процессы вероятны.

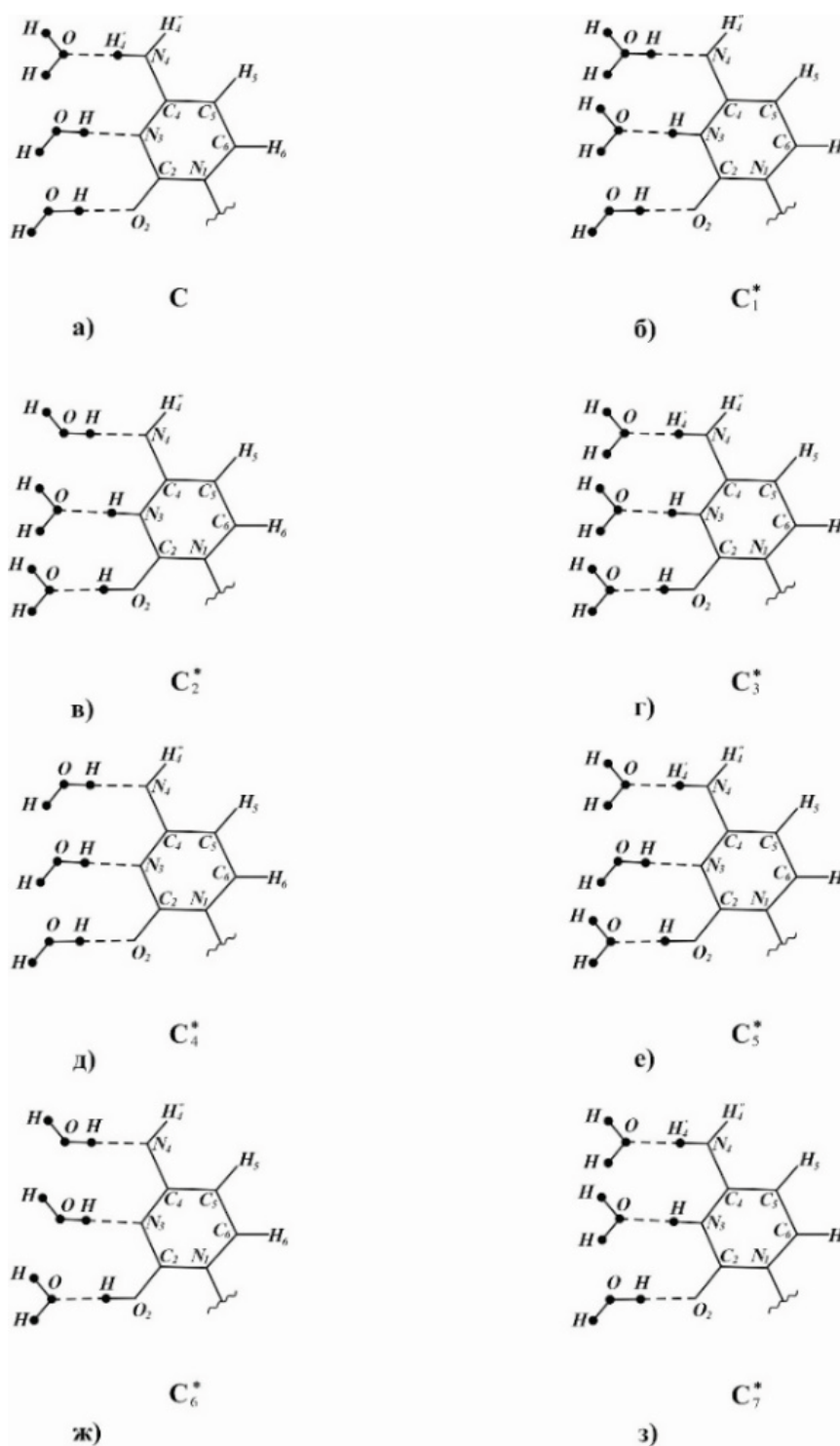


Рисунок 4. Редкие таутомеры цитозина, которые могут образовываться в одноцепочечной ДНК, находящейся в водной среде

Редкие таутомерные формы оснований ДНК, образующиеся в одноцепочечной ДНК при облучении ее ультрафиолетовым светом. Одноцепочечная ДНК находится в водной среде. При этом молекулы воды присоединяются к молекуле ДНК с помощью водородных связей. Молекулы воды присоединяются ко всем молекулам тимина. Однако в данной работе изучается процесс образования только тех редких таутомерных форм оснований ДНК, которые могут приводить к мутациям.

При облучении одноцепочечной ДНК, связанной с молекулами воды водородными связями, могут образовываться все возможные таутомеры тимина (рис. 2), аденина (рис. 3), цитозина (рис. 4) и гуанина (рис. 5). Другими словами, образуется 7 новых редких таутомеров тимина (рис. 26-32), 7 новых редких таутомеров аденина (рис. 36-42), 7 новых редких таутомеров цитозина (рис. 46-52) и 7 новых редких таутомеров гуанина (рис. 56-62).

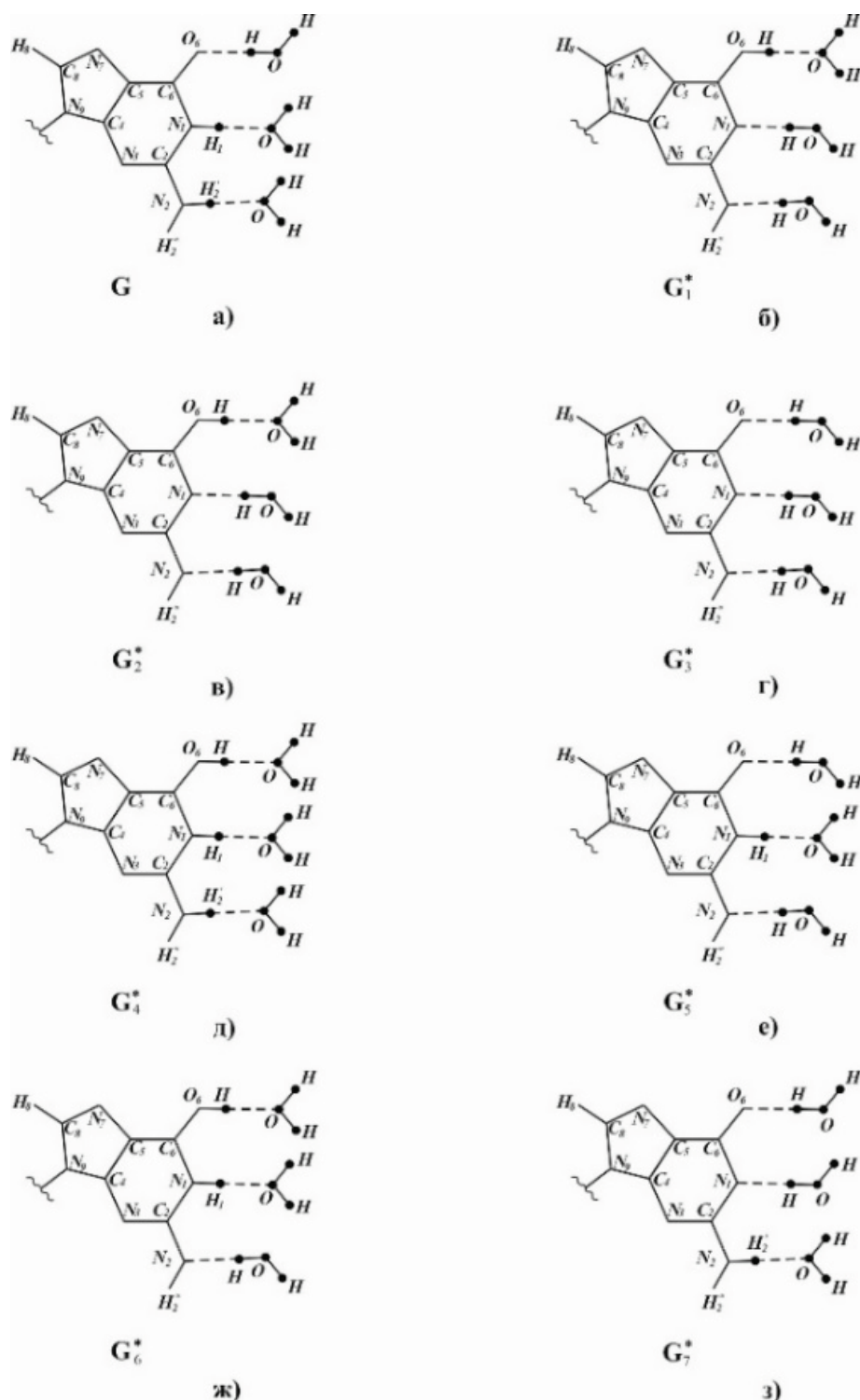


Рисунок 5. Редкие таутомеры гуанина, которые могут образовываться в одноцепочечной ДНК, находящейся в водной среде

Как показано в работе [16], из-за контакта с молекулами воды основания ДНК не могут изменять таутомерные состояния. Эти выводы подтверждаются экспериментальными данными [9,10]. Следовательно, все редкие таутомеры оснований одноцепочечной ДНК будут стабильными.

Выводы. В случае возникновения новой эпидемии, вызванной вирусами, было бы полезно заранее знать, будет ли данный вирус характеризоваться высокой или низкой скоростью образования мутаций. Для того, чтобы предсказать, будет ли данный вирус характеризоваться высокой или низкой скоростью образования мутаций, надо изучить особенности мутагенеза в различных вирусах. А именно, в вирусах, содержащих одноцепочечные ДНК и РНК, а также двухцепочечные ДНК и РНК.

Автором были разработаны полимеразно-таутомерные модели образования различных мутаций, образующихся при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом [15-39,42]. Экспериментальные данные [9,10] подтверждают полимеразно-таутомерные модели [15-39,42].

В данной работе показано, что механизм образования редких таутомеров оснований одноцепочечной РНК, образующихся при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом [40,41], справедлив и для одноцепочечной ДНК. Впервые показано, что возможно образование семи стабильных редких таутомеров оснований ДНК при облучении одноцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом, которые способны влиять на характер спаривания оснований.

Список литературы / References:

1. Lawrence C.M., Menon S., Eilers B.J., Bothner B., Khayat R., Douglas T., Young M.J. Structural and functional studies of archaeal viruses. *Journal of biological chemistry*, 2009, vol. 284, no. 19, pp. 12599-12603.
2. Breitbart M., Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in microbiology*, 2005, vol. 13, no. 6, pp. 278-284.
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 536-544.
4. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature reviews. Microbiology*, 2021, vol. 19, no. 3, pp. 155-170.
5. Rice A.M., Castillo Morales A., Ho A.T., Mordstein C., Muhlhausen S., Watson S., Cano L., Young B., Kudla G., Laurence D.H. Evidence for strong mutation bias in toward, and selection against, U content SARS-CoV-2: implication for vaccine design. *Molecular biology and evolution*, 2021, vol. 38, no. 1, pp. 67-83.
6. Koyama T., Platt D., Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bulletin of the World Health Organization. Bulletin of the world health organization*, 2020, vol. 98, no. 7, pp. 495-504.
7. Tang M., Pham P., Shen X., Taylor J.-S., O'Donnell M., Woodgate R., Goodman M. Roles of *Escherichia coli* DNA polymerase IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature*, 2000, vol. 404, no. 6781, pp. 1014-1018.
8. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions. *Mutation research*, 2002, vol. 510, no. 1, pp. 55-70.
9. Bebenek K., Pedersen L.C., Kunkel T.A. Replication infidelity via a mismatch with Watson-Crick geometry. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 5, pp. 1862-1867.
10. Wang W., Hellinga H.W., Beese L.S. Structural evidence for the rare tautomer hypothesis of spontaneous mutagenesis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 43, pp. 17644-17648.
11. Watson J.D., Crick F.H.C. The structure of DNA. *Cold spring Harbor symposia on quantitative biology*, 1953, vol. 18, pp. 123-131.
12. Podolyan Y., Gorb L., Leszczynski J. *Ab initio* study of the prototropic tautomerism of cytosine and guanine and their contribution to spontaneous point mutations. *International journal of molecular sciences*, 2003, vol. 4, no. 7, pp. 410-421.
13. Lee D.-H., Pfeifer G.P. Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis. *Journal of biological chemistry*, 2003, vol. 278, pp. 10314-10321.
14. Horsfall M.J., Borden A., Lawrence C.W. Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer. *Journal of bacteriology*, 1997, vol. 179, pp. 2835-2839.
15. Grebneva H.A. Nature and possible mechanisms formation of potential mutations arising at emerging of thymine dimers after irradiation of double-stranded DNA by ultraviolet light. *Journal of molecule structure*, 2003, vol. 645, pp. 133-143.
16. Grebneva H.A. A model for targeted substitution mutagenesis during SOS replication of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2006, vol. 47, no. 9, pp. 733-745.
17. Гребнева Е.А. Три источника потенциальных немишеных ультрафиолетовых мутаций. Сборник трудов VI Всеукраинской научно-технической конференции. *Материалы VI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии»*. Украина, г. Севастополь, 26-30 апреля 2010, с. 15-18 [Grebneva H.A. Three sources of potential untargeted ultraviolet mutations. *Proceedings of the VI All-Ukrainian Scientific and Technical Conference "Modern trends in biological physics and chemistry"*. Ukraine, Sevastopol, April 26-30, 2010, pp. 15-18 (In Russ.)].
18. Гребнева Е.А. Природа и механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. *Доклады НАН Украины*, 2012, № 10, с. 181-187 [Grebneva H.A. Nature and mechanisms of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis. *Dopovidi NAN Ukraine*, 2012, no. 10, pp. 181-187 (In Russ.)].
19. Гребнева Е.А. Механизм образования делеций при синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры. *Материалы VIII Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»*, Севастополь, 23-27 апреля 2012 г., с. 88-90 [Grebneva H.A. The mechanism of deletion formation during the synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *Proceedings of the VIII International Scientific and Technical Conference "Modern trends in biological physics and chemistry"*, Sevastopol, April 23-27, 2012, pp. 88-90 (In Russ.)].
20. Гребнева Е.А. Механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетовых мишеных мутаций замены оснований. *Материалы IX Международной научно-технической конференции «Актуальные*

вопросы биологической физики и химии», Севастополь, 23-27 апреля 2013 г., с. 18-20 [Grebneva H.A. Mechanisms of formation of hot and cold spots of ultraviolet targeted base substitution mutations. *Proceedings of the IX International Scientific and Technical Conference "Modern trends in biological physics and chemistry"*, Sevastopol, April 23-27, 2013, pp. 18-20 (In Russ.)].

21. Гребнева Е.А. Механизмы мишенных мутаций сдвига рамки считывания – появление инсерций при склонном к ошибкам или SOS синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Молекулярная биология*, 2014, т. 48, № 4, с. 531-542 [Grebneva H.A. Mechanisms of targeted frameshift mutations – insertion formation under error-prone or SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Molecular Biology (Moscow)*, 2014, vol. 48, no. 4, pp. 457-467 (In Russ.)].

22. Grebneva H.A. A polymerase – tautomeric model for targeted frameshift mutations: deletions formation during error-prone or SOS replication of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Journal of Photonic Materials and Technology*, 2015, vol. 1, no. 2, pp. 19-26.

23. Гребнева Е.А. Механизмы образования мишенных сложных инсерций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Доклады НАН Украины*, 2015, № 5, с. 145-154 [Grebneva H.A. Mechanisms for the formation of targeted complex insertions during the synthesis of a DNA molecule containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Dopovidi NAN Ukraine*, 2015, no. 5, pp. 145-154 (In Russ.)].

24. Гребнева Е.А. Механизмы образования мишенных инсерций при склонном к ошибкам или SOS-синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Материалы X Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»*. Севастополь 17-21 августа 2015, с. 70-74 [Grebneva H.A. Mechanisms of formation of targeted insertions during error-prone or SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Proceedings of the X International Scientific and Technical Conference "Modern trends in biological physics and chemistry"*. Sevastopol, August 17-21, 2015, pp. 70-74 (In Russ.)].

25. Гребнева Е.А. Полимеразно-таутомерная модель механизма образования мишенных сложных инсерций при синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Материалы XI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»* в 2 томах, Севастопольский государственный университет, т. 1, 298 с., Севастополь, 25-29 апреля 2016, с. 156-160 [Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric model of the mechanism of formation of targeted complex insertions during the synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Proceedings of the XI International Scientific and Technical Conference "Modern trends in biological physics and chemistry"* in 2 volumes, Sevastopol State University, vol. 1, 298 p., Sevastopol April 25-29, 2016, p. 156-160 (In Russ.)].

26. Grebneva H.A. A polymerase–tautomeric model for radiation-induced bystander effects: a model for untargeted substitution mutagenesis during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA containing thymine and adenine in rare tautomeric forms. *International journal of molecular biology: open access*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 1-14.

27. Grebneva H.A. A Polymerase-tautomeric model for targeted substitution mutations formation during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *International journal of molecular biology: open access*, 2016, vol. I, no. 1, pp. 1-16.

28. Grebneva H.A. *Polymerase-tautomeric model for ultraviolet mutagenesis: targeted base substitution and frameshift mutations caused by cis-syn cyclobutane thymine dimers*. Germany, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2017, 132 p.

29. Grebneva H.A. A polymerase-tautomeric model for radiation-induced genomic instability: targeted delayed substitution mutations during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *International journal of molecular biology: open access*, 2018, vol. 3, pp. 125-141.

30. Grebneva H.A. Paradigm change in mutagenesis: polymerase-tautomeric models for targeted, delayed and untargeted ultraviolet mutagenesis during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *International journal of molecular biology: open access*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 1-15.

31. Grebneva H.A. *Theory of thermal relaxation of the excitation energy of hydrogen bonds in DNA. Its contribution to ultraviolet mutagenesis*. Saarbrücken, Germany. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2019, 345 p.

32. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric model for untargeted delayed base substitution mutations formation during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA containing thymine and adenine in some rare tautomeric forms. *Journal of oncology research*, 2019, vol. 1, no. 2, pp. 24-37.

33. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric models for *A-rule* during error-prone and SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers or thymines and adenines in some rare tautomeric forms. *Trends in cell & molecular biology*, 2019, vol. 14, pp. 51-68.

34. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric cancer risk model: the formation of 100% mutations is due to exposure to mutagens. *Trends in cell & molecular biology*, 2020, vol. 15, pp. 13-28.

35. Гребнева Е.А. Метод предсказания относительных вероятностей образования *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров и редких таутомерных форм оснований ДНК на любых сайтах двунигетовой ДНК. *Физика и техника высоких давлений*, 2021, т. 31, № 3, с. 88-103 [Grebneva H.A. Method for calculating the relative probabilities of the formation of *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers and rare tautomeric forms of DNA bases at any sites of double-stranded DNA. *Fizika and tekhnika visokih davleniy*, 2021, vol. 31, no. 3, pp. 88-103 (In Russ.)].

36. Гребнева Е.А. Процент мутаций, образующихся под воздействием мутагенов. *Физика и техника высоких давлений*, 2022, т. 32, № 1, с. 101-113 [Grebneva H.A. The percentage of mutations that are formed under the influence of mutagens. *Fizika and tekhnika visokih davleniy*, 2022, vol. 32, no. 1, pp. 101-113 (In Russ.)].

37. Гребнева Е.А. Полимеразно-таутомерная модель риска образования злокачественных опухолей. *Физика и техника высоких давлений*, 2022, т. 32, № 4, с. 99-104 [Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric model of the risk of malignant tumor formation. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2022, vol. 32, no. 4, pp. 99-104 (In Russ.)].
38. Гребнева Е.А. Модель образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза на участке двухцепочечной ДНК *supF* гена. *Физика и техника высоких давлений*, 2023, т. 33, № 2, с. 101-111 [Grebneva E.A. A model for the formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis in the double-stranded DNA region of the *supF* gene. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2023, vol. 33, no. 2, pp. 101-111 (In Russ.)].
39. Гребнева Е.А. Интерпретация горячих пятен ультрафиолетового мутагенеза, образующихся на запаздывающей нити двухцепочечной ДНК *supF*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 2, с. 125-132. [Grebneva H.A. Interpretation of hot spots of ultraviolet mutagenesis formed on the lagging strand of *supF* double-stranded DNA. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2023, vol. 8, no. 2, pp. 125-132 (In Russ.)].
40. Гребнева Е.А. Механизм образования редких таутомерных форм урацила и аденина при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом. *Физика и техника высоких давлений*, 2024, т. 34, № 1, с. 96-104 [Grebneva H.A. Mechanism of formation of rare tautomeric forms of uracil and adenine when single-stranded RNA is irradiated with ultraviolet light. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2024, vol. 34, no. 1, pp. 96-104 (In Russ.)].
41. Гребнева Е.А. Механизм образования редких таутомерных форм цитозина и гуанина при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2024, т. 9, № 1, с. 7-15 [Grebneva H.A. Mechanism of formation of rare tautomeric forms of cytosine and guanine when single-stranded RNA is irradiated with ultraviolet light. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2024, vol. 9, no. 1, pp. 7-15 (In Russ.)].
42. Гребнева Е.А. Полимеразно-таутомерные модели инсерционного мутагенеза: механизм образования мишеней инсерций при склонном к ошибкам и SOS синтезе двухцепочечной ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминовые димеры. *Физика и техника высоких давлений*, 2025, т. 35, № 3 [Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric models for insertional mutagenesis: the mechanisms of formation of targeted insertions during error-prone and SOS synthesis of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2025, vol. 35, no. 3 (In Russ.)].
43. Raghunathan G., Kieber-Emmons T., Rein R., Alderfer J.L. Conformation features of DNA containing a *cis-syn* photodimer. *Journal of biological structure and dynamics*, 1990, vol. 7, no. 4, pp. 899-913.
44. Cooney M.G., Miller J.H. Calculated distortions of duplex DNA by a *cis, syn* cyclobutane thymine dimer are unaffected by a 3' TPA step. *Nucleic acids research*, 1997, vol. 25, no. 7, pp. 1432-1436.
45. McAteer K., Jing Y., Kao J., Taylor J.-S., Kennedy M.A. Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a *cis-syn* thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA. *Journal of molecular biology*, 1998, vol. 282, no. 5, pp. 1013-1032.
46. Yamaguchi H., van Aalten D.M., Pinak M., Furukawa A., Osman R.H. Essential dynamics of DNA containing a *cis-syn* cyclobutane thymine dimer lesion. *Nucleic acids research*, 1998, vol. 26, no. 8, pp. 1939-1946.
47. Моссе И.Б. Радиогенетические эффекты в клетках эукариот. В кн. *Радиационный мутагенез и его роль в эволюции и селекции*. М.: Наука, 1987, с. 73-84 [Mosse I.B. Radiogenetics effects in eukaryotic cells. In: *Radiation mutagenesis and its role in evolution and selection*. M.: Nauka, 1987, pp. 73-83 (In Russ.)].
48. Barltrop J.A., Coyle J.D. *Excited states in organic chemistry*. Wiley, New York, 1978, 446 p.
49. Векшин Н.Л. *Фотоника биологических структур*. Пушчино: Институт биологической физики АН СССР, 1988, 51 с. [Vekshin N.L. *Photonics of biological structures*. Pushchino: Institute of Biological Physics of the Academy of Sciences of the USSR, 1988, 51 p. (In Russ.)].
50. Векшин Н.Л. *Перенос возбуждения в макромолекулах*. Итоги науки и техники. Серия Радиационная химия. Фотохимия. М.: ВИНТИ, 1989, т. 7, 164 с. [Vekshin N.L. *Transfer of excitation in macromolecules*. Results of science and technology. Series Radiation Chemistry. Photochemistry. M.: VINITI, 1989, vol. 7, 164 p. (In Russ.)].
51. Гребнева Е.А., Толпыго К.Б. Влияние водородных связей между спаренными основаниями ДНК на колебания их боковых групп. *Украинский физический журнал*, 1989, т. 34, № 12, с. 1791-1796 [Grebneva H.A., Tolpygo K.B. Influence of the hydrogen bonds between paired bases of DNA on vibrations of the side groups. *Ukraine physical journal*, 1989, vol. 34, no. 12, pp. 1791-1796 (In Russ.)].
52. Tolpygo K.B., Grebneva H.A. Effect of the state of h-b-l hydrogen bond of the character of some atom vibrations in guanine-cytosine pair of the DNA molecule. *International journal of quantum chemistry*, 1996, vol. 57, no. 2, pp. 219-227.
53. Гребнева Е.А. Облучение ДНК ультрафиолетовым светом: потенциальные изменения и мутации. *Молекулярная биология*, 1994, т. 28, № 4, с. 805-812 [Grebneva H.A. The irradiation of DNA by ultraviolet light: potential alterations and mutations. *Molecular biology (Mosk.)*, 1994, vol. 28, no. 12, pp. 805-812 (In Russ.)].
54. Гребнева Е.А., Толпыго К.Б. Электростатическое взаимодействие, протонный потенциал и свойства водородных связей в системе гуанин – цитозин. *Украинский физический журнал*, 1988, т. 33, № 10, с. 1456-1462 [Grebneva H.A., Tolpygo K.B. Electrostatic interaction; potential of proton and properties of hydrogen bonds in the system of guanine - cytosine. *Ukraine physical journal*, 1988, vol. 33, no. 10, pp. 1456-1462 (In Russ.)].
55. Гребнева Е.А. Протонные потенциалы для широкого спектра изменения длины водородной связи в димере воды. *Журнал структурной химии*, 1997, т. 38, № 3, с. 422-430 [Grebneva H.A. Proton potential for broad

spectrum of hydrogen bond length in water dimer. *Zhurnal strukturnoi khimii*, 1997, vol. 38, no. 3, pp. 422-430 (In Russ.).

56. Соколов Н.Д., Чулановский В.М. *Водородная связь*. М.: Наука, 1964, 340 с. [Sokolov N.D., Chulanovsky B.M. (Eds). *Hydrogen bond*. M.: Nauka, 1964, 340 p. (In Russ.)].

57. Ольховская Ж.П., Толпыго К.Б. Изменение состояния водородной связи при оптическом возбуждении спаренных оснований нуклеиновых кислот. *Украинский физический журнал*, 1970, т. 15, № 9, с. 1453-1458 [Olkhovskaya Zh.P., Tolpygo K.B. Alteration of hydrogen bond state under optical excitation of paired bases of nucleic asides. *Ukraine physical journal*, 1970, vol. 15, no. 9, pp. 1453-1458 (In Russ.)].

58. Grebneva H.A., Tolpygo K.B. The heat deexcitation of hydrogen bond protons in paired bases of DNA molecules. *Studia biophysica*, 1990, vol. 135, no. 2, pp. 115-120.

59. Данилов В.И., Михалева О.В., Слюсарчук О.Н., Стюарт Дж.Дж., Альдерфер Дж.Л. О новом механизме мутаций, индуцируемых УФ-светом. Теоретическое изучение двухпротонной фототаутомеризации в модельных парах оснований ДНК. *Биополимеры и клетка*, 1997, т. 13, № 4, с. 261-268 [Danilov V.I., Mikhaleva O.V., Slyusarchuk O.N., Stewart J.J., Alderfer J.L. On the new mechanism of mutations induced by UV-light. A theoretical study of the double-proton phototautomerism in a model base pair of DNA. *Biopolymers and cell*, 1997, vol. 13, no. 4, pp. 261-268 (In Russ.)].

MECHANISM OF RARE TAUTOMERS FORMATION OF DNA BASES WHEN SINGLE-STRANDED DNA IS IRRADIATED WITH ULTRAVIOLET LIGHT

Grebneva H.A.

Donetsk Institute of Physics and Technology named after A. A. Galkina
R. Luxembourg str. 72, Donetsk, 83114, Russia; e-mail: grebneva@gmail.com

Received 14.06.2025

Abstract. In order to predict the rate of mutation formation in various viruses, it is necessary to develop mechanisms for the formation of mutations in single-stranded DNA and RNA, and double-stranded RNA and DNA. To construct polymerase-tautomeric models of UV mutagenesis of viruses, it is first necessary to find rare tautomers formed of DNA and RNA bases when single- and double-stranded DNA and RNA molecules are irradiated with ultraviolet light. This work shows that the mechanism for the formation of rare tautomers single-stranded RNA bases that are formed when they are irradiated with ultraviolet light is also valid for the formation of rare tautomers of bases in single-stranded DNA. Single-stranded DNA is found in an aqueous environment. In this case, water molecules are attached to the DNA molecule using hydrogen bonds. Three channels of relaxation of electronic vibrational states are possible. The formation of rare tautomeric forms of DNA bases occurs during nonradiative relaxation of excitation energy. This leads to strong forced fluctuations in the lengths of hydrogen bonds and changes in the tautomeric states of DNA bases. When irradiating single-stranded DNA bound to water molecules by hydrogen bonds, all possible tautomers of cytosine, guanine, thymine and adenine can be formed, which can influence the nature of base pairing. It has been shown that the formation of 7 rare tautomers of cytosine, guanine, thymine and adenine is possible, those that can influence the nature of base pairing. Such rare tautomers will be stable in single-stranded DNA in an aqueous environment.

Key words: ultraviolet mutagenesis, mutagenesis of viruses, rare cytosine tautomers, rare guanine tautomers, rare thymine tautomers, rare adenine tautomers, single-stranded DNA.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО ПОВЕДЕНИЯ И ЭЛЕКТРОННОЙ СТРУКТУРЫ АНТИМИКРОБНОГО ТЕТРАПЕПТИДА WRWR

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

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. Академика З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2025

Аннотация. С помощью метода молекулярной механики и квантово-химических расчетов исследовано пространственное и электронное строение антимикробного тетрапептида WRWR (Trp-Arg-Trp-Ar). Антимикробные пептиды считаются перспективными антибиотиками, благодаря широкому спектру антимикробных свойств и способности убивать бактерии с лекарственной устойчивостью. Подбор первичных структурных вариантов молекулы тетрапептида WRWR осуществлялся на основе стабильных конформаций соответствующих аминокислотных остатков. В результате расчетов был выявлен ограниченный набор энергетически предпочтительных конформационных состояний тетрапептида WRWR в определенном интервале энергии. Были определены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях молекулы. Конформационный анализ тетрапептида дал возможность определить природу сил, стабилизирующих энергетически предпочтительных пространственных структур молекулы, были также определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов, величины энергетических вкладов взаимодействий между остатками. Было выявлено также взаимное расположение остатков и их боковых цепей в низкоэнергетических конформациях тетрапептида WRWR. Методом квантово-химических расчетов были определены энергетические и электронные характеристики оптимальных пространственных структур молекулы тетрапептида WRWR. На основе полученных величин двугранных углов были построены молекулярные модели стабильных конформаций тетрапептида WRWR, сопоставление которых позволило выделить структурные особенности, важные для когструирования лекарственных препаратов, пригодных для клинического использования.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, конформация, метод молекулярной механики, квантово-химический метод.

Как известно, антимикробные пептиды синтезируются в организме иммунной системой в ответ на заражение чужеродными бактериями, вирусами или грибами. Эти пептиды считаются перспективными антибиотиками, благодаря широкому спектру антимикробных свойств и способности убивать бактерии с лекарственной устойчивостью. Известно, что антимикробные пептиды убивают бактерии, быстро разрушая их мембраны. Они оказывают свое бактерицидное действие, нацеливаясь и разрушая бактериальные клеточные мембраны, вызывая лизис и смерть клеток, что дает им потенциальное преимущество перед обычными антибиотиками. Однако большие размеры таких пептидов не способствовали их фармацевтической разработке. Поэтому было проведено множество исследований для выявления эффективных коротких антимикробных пептидов. Так в работах [1,2] была выявлена антимикробная активность в коротких пептидах, состоящих из природных аминокислот, таких как триптофан и аргинин (W и R). Были исследованы взаимодействия тетрапептида WRWR-NH₂ с мембранами эритроцитов и мембраной грамположительной бактериальной клетки [3]. Как показали результаты исследования мономеры тетрапептида, взаимодействуя с мембранами, полностью покрывают их поверхность. Для биологического действия молекулы тетрапептида необходимо осуществление его структурной комплементарности с взаимодействующими мембранами. Поэтому для выяснения механизма и специфичности действия тетрапептида WRWR важно получить информацию о детальной третичной структуре и конформационной динамике молекулы. В связи с этим нами было проведено конформационное исследование тетрапептида WRWR с использованием метода молекулярной механики (ММ). Конформационное исследование позволяет определить ход пептидного остова молекулы, ориентацию и конформационную динамику боковых цепей аминокислотных остатков, т.е. допустимые отклонения двугранных углов боковых цепей от оптимальных значений для энергетически предпочтительных конформаций молекулы. Такое исследование тетрапептида поможет предоставить важную информацию о структурных и конформационных особенностях, необходимых для распознавания и связывания тетрапептида с мембранами бактериальных клеток.

Как известно пространственное и электронное строение молекулы также тесно взаимосвязаны: при изменении положения ядра меняется электронное строение, в результате меняется характер взаимодействия и функциональные свойства молекулы. Перемещение отдельных атомных групп в пределах пептидной молекулы в зависимости от заряда, электростатического поля или конформационного изменения играют существенную роль в определении структуры и связывающих свойств молекулы. Электронная структура тетрапептида может являться ключом для его продуктивного взаимодействия с поверхностью мембраны.

В данной работе расчет стабильных конформаций тетрапептида WRWR-NH₂ проводился методом молекулярной механики (ММ). Метод ММ упрощает полную потенциальную энергию молекулярной системы до суммы нескольких физически значимых членов взаимодействия. Функция потенциальной энергии и

вовлечённые параметры образуют так называемое силовое поле. Силовое поле является краеугольным камнем любого молекулярного моделирования ММ. Надёжное описание конформационной энергии критически важно для моделирования структур и динамики биологических молекул. Для получения достаточно точной конформационной энергии для биологических приложений необходимо должным образом учитывать слабые невалентные взаимодействия. В расчетах молекулярной механики конформационная потенциальная энергия молекулы рассчитывается как сумма независимых вкладов невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и водородных связей. Влияние растворителя было включено в диэлектрическую постоянную, которая взята равным величине 10, которая наиболее удовлетворительно оценивает электростатическую составляющую конформационной энергии пептида в водной среде. Предполагалась жесткая валентная геометрия молекулы, а именно, поиск проводился только по торсионным углам.

При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [4]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов ϕ , ψ и ω основной цепи и χ^i , боковых цепей. Принято понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов ϕ и ψ . Выбор структурных вариантов при расчете конформаций тетрапептида осуществлялся на основе известных значений двугранных углов (ϕ и ψ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты для каждого монопептида. Углы ϕ и ψ основной цепи в конформациях находятся из низкоэнергетических областей стерической карты: R ($\phi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), B ($\phi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\phi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\phi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Отсчет двугранных углов вращения ϕ , ψ , ω и χ^i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [5]. Расчет стабильных конформаций тетрапептида проводился с помощью программы [6]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [6].

Электронное строение молекулы тетрапептида изучалось с помощью полуэмпирического метода квантовой химии AM1, позволяющего количественно оценить суммарное влияние структурных изменений на распределение электронной плотности молекулы в целом и в любой ее части. Расчеты электронной структуры проводились с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0 [7], позволяющего проводить квантово-химические расчеты молекул методом AM1 [8].

Как видно антимикробный тетрапептид WRWR-NH₂ содержит два остатка триптофана с объемным индольным кольцом в боковой цепи, два остатка аргинина с положительно заряженной гуанидиновой группой в боковой цепи и амидную группу на конце. При составлении структурных вариантов тетрапептида ориентации боковых цепей остатков брались с учетом возможных межостаточных взаимодействий, образуемых данными остатками в каждом конкретном конформационном состоянии. В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов были найдены низкоэнергетические конформации тетрапептида. В таблице 1 приведены рассчитанные величины двугранных углов трех самых низкоэнергетических конформаций тетрапептида WRWR. На рисунке 1 представлены молекулярные модели трех энергетически предпочтительных конформаций молекулы тетрапептида WRWR, составленные на базе рассчитанных величин двугранных углов аминокислотных остатков.

В результате расчетов энергетически предпочтительной структурой для тетрапептида WRWR оказалась конформация с формой пептидной цепи BRBB, способствующая образованию эффективных ди- и трипептидных дисперсионных взаимодействий. Следует отметить, что все три самые низкоэнергетические конформации тетрапептида формируют изгиб пептидного остова. Образование системы дисперсионных и электростатических взаимодействий между пептидными звеньями соседних остатков тетрапептида придает изгибной структуре стабильных конформаций особую прочность. Своеобразие аминокислотной последовательности тетрапептида способствует образованию стабильных пространственных структур, но при этом боковые цепи чередующихся остатков триптофана и аргинина не участвуют в водородных связях внутри молекулы, а вытянуты наружу, как бы для участия с возможными контактерами. Такое расположение боковых цепей триптофанов и аргининов предполагает их готовность к взаимодействию с поверхностью мембран клеток.

При расчете электронной структуры молекулы тетрапептида суммарный заряд системы брался равным нулю, для каждой конформации учитывалось число электронов, количество заселенных уровней и исходное число орбиталей. На рисунке 2 приведены распределения электростатического потенциала в энергетически предпочтительных конформациях тетрапептида. Поскольку электростатический потенциал часто позволяет интерпретировать электрофильные и нуклеофильные свойства молекулы в основном и электронно-возбужденном состояниях, то он становится чувствителен даже к самым малым изменениям молекулярной структуры. И этот факт привел к использованию электростатического потенциала молекулы в качестве показателей реакционной и селективной способностей молекулы. На рисунке 2 области отрицательного потенциала обозначены пунктирными линиями, положительного потенциала – сплошными линиями. В таблице 2 показаны величины электронных параметров для низкоэнергетических конформаций молекулы тетрапептида, рассчитанные по методу AM1. Следует отметить, что наличие в тетрапептиде положительно заряженных гуанидиновых групп остатка аргинина может играть существенную роль в его реакционной способности, т.е. биологической активности.

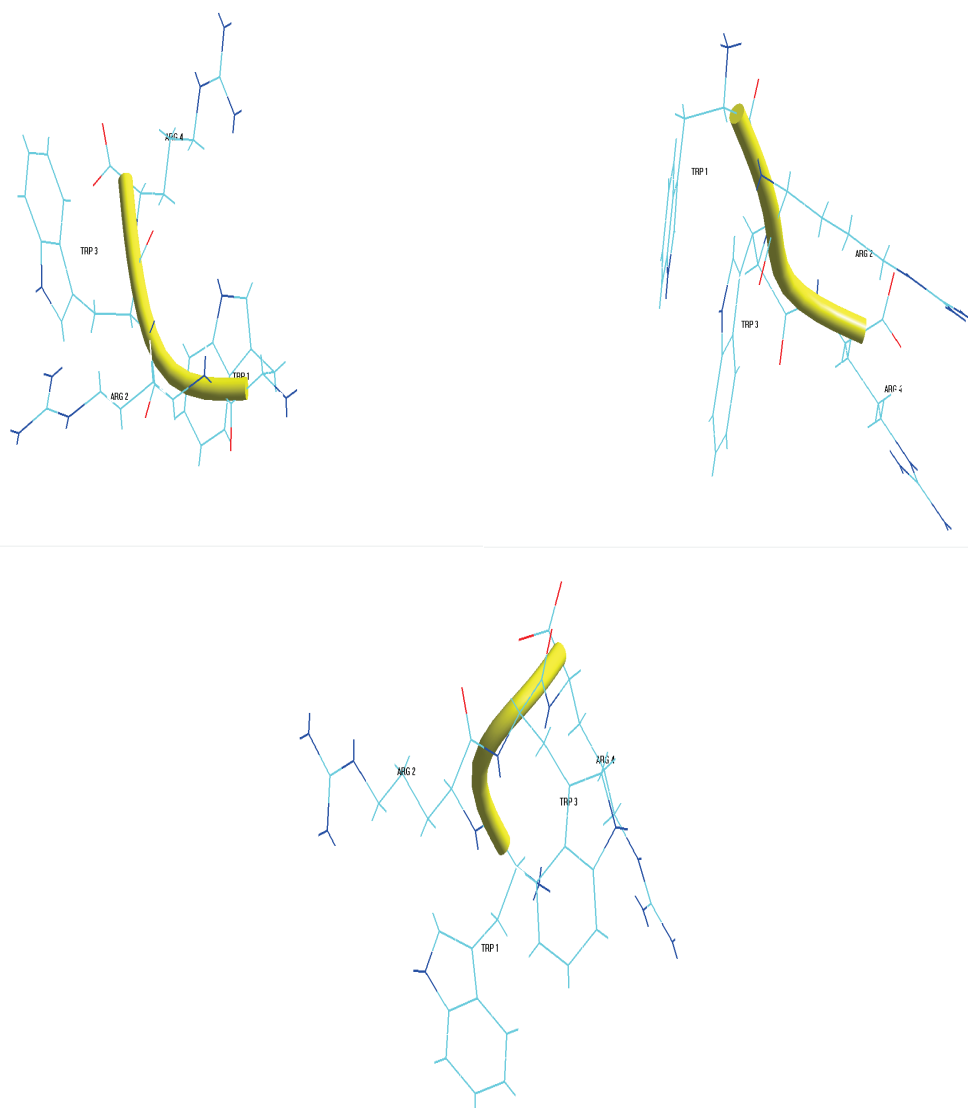


Рисунок 1. Молекулярные модели трех наиболее низкоэнергетических конформаций тетрапептида WRWR. Желтой линией показан ход пептидной цепи

Таблица 1. Величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков тетрапептида WRWR в стабильных конформациях: I – BRBB (0,0 ккал/моль), II – BBRR (1,6 ккал/моль), III – RRRR (1,9 ккал/моль)

Остаток	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		φ	ψ	ω	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Trp1	I	-71	148	179	178	83		
	II	-173	150	183	182	74		
	III	-36	-41	175	65	83		
Arg2	I	-126	-59	185	181	178	179	180
	II	-120	123	175	181	179	179	180
	III	-83	-44	-184	182	177	179	179
Trp3	I	-154	155	177	180	81		
	II	-71	-74	180	168	64		
	III	-70	-27	-182	63	90		
Arg4	I	-119	124	179	180	178	179	180
	II	-129	-57	180	185	178	179	179
	III	-70	-48	-177	-65	183	183	178

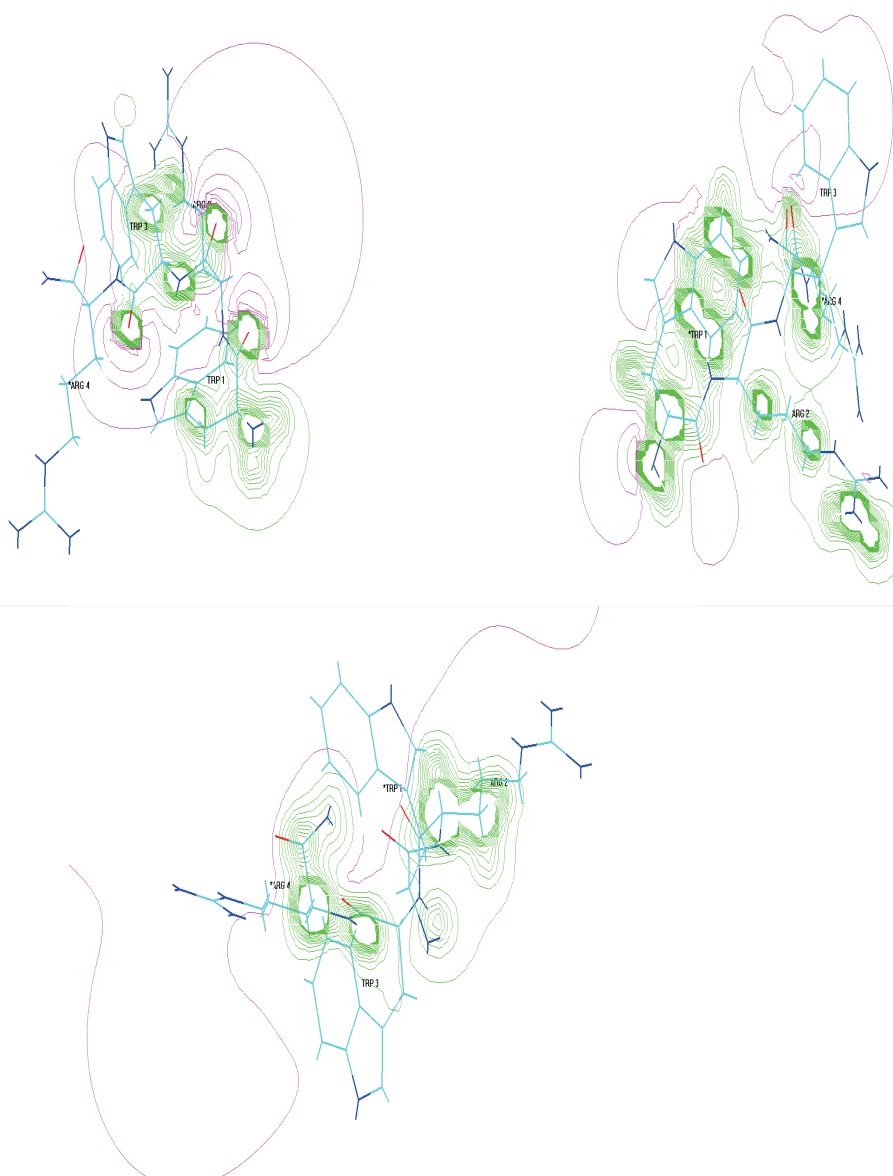


Рисунок 2. Распределение электростатического потенциала в трех стабильных конформациях молекулы антимикробного тетрапептида WRWR

Таблица 2. Величины электронных параметров в трех стабильных конформациях молекулы антимикробного тетрапептида WRWR

Конформация	Полная энергия	Энергия связывания	Энергия изолированных атомов	Электронная энергия	Энергия взаимодействия ядер	Суммарный дипольный момент (Debye)
Конформер1	-206613	-8905	-197707	-2488665	2282051	8
Конформер2	-205739	-8294	-197444	-2538688	2332949	9
Конформер3	-206964	-9256	-197707	-2447965	2241001	13

Помимо всего в молекуле тетрапептида WRWR наличие двух реакционноспособных центров – атома кислорода карбонильной группы и атома азота аминогруппы – позволяет им в принципе образовывать два типа связей с молекулами донорами протона. Связь C=O карбонильной группы является эффективным акцептором протонов, обладает высокой химической активностью и способностью к образованию межмолекулярных контактов. Расчеты выявили высокую электронную плотность вблизи атомов кислорода во всех низкоэнергетических конформациях тетрапептида. Как оказалось, наиболее большие отрицательные заряды в тетрапептиде сконцентрированы именно на атомах кислорода карбонильных групп и атомах азота аминогруппы.

Полученные в результате расчетов величины энергетических и электронных параметров в стабильных конформационных состояниях тетрапептида WRWR дают представление о пространственном строении молекулы. В результате расчетов были определены и сопоставлены величины энергетических вкладов взаимодействий между аминокислотными остатками в низкоэнергетических конформационных состояниях молекулы. Выявленные особенности пространственной и электронной структуры антимикробного тетрапептида WRWR могут способствовать целенаправленному поиску эффективных аналогов молекулы в качестве лекарственных препаратов для осуществления конкретного физиологического воздействия в лечении ряда воспалительных заболеваний. По всей видимости, что среди рассчитанных низкоэнергетических структур тетрапептида WRWR может находиться биологически активная конформация, способная участвовать в процессе связывания с поверхностью мембран бактерий.

Список литературы / References:

1. Murugan R.N., Jacob B., Kim E.-H., Ahn M., Sohn H., Seo J.-H., Cheong C., Hyun J.-K., Lee K.S., Shin S.Y., Bamg J.K. Non hemolytic short peptidomimetics as a new class of potent and broad-spectrum antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, vol. 23, pp. 4633-4636, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.06.016.
2. Lau Q.Y., Ng F.M., Cheong J.W.D., Yap Y.Y.A., Tan Y.T.F., Jureen R., Hill J., Chia C.S.B. Discovery of an ultra-short linear antibacterial tetrapeptide with anti-MRSA activity from a structure-activity relationship study. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, vol. 13, no. 105, pp. 138-144, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.10.015.
3. Liu L., Zhao L., Liu L., Yue S., Wang J., Cao Z. Influence of Different Aromatic Hydrophobic Residues on the Antimicrobial Activity and Membrane Selectivity of BRBR-NH₂ Tetrapeptide. *American Chemical Society*, 2020, vol. 36, no. 50, pp. 15331-15342, doi: 10.1021/acs.LANGMUIR.0c02777.
4. Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Особенности пространственной организации молекул гемокина-1 человека и гемокина-1 мыши/крысы. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 3, с. 457-470 [Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godjaev N.M., Features of the spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 457-470 (In Russ.)].
5. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.
6. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148 [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godzhaev N.M. A program for semi-empirical calculation of conformations of molecular complexes on a computer. *Journal of Structural Chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148 (In Russ.)].
7. Chem 3D Pro, Molecular Modeling and Analysis. *Cambridge Soft Corporation*, U.S.A, 875 Massachusetts, 2005, 02139.
8. Dewar J.S., Zuebsch E., Healy E.F., Stewart J.J.P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, vol. 107, pp. 3902-3909.

MOLECULAR MODELING OF CONFORMATIONAL BEHAVIOR AND ELECTRONIC STRUCTURE OF THE ANTIMICROBIAL TETRAPEPTIDE WRWR

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

Baku State University, Institute for Physical Problem

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

Received 07.07.2025

Abstract. By means of molecular mechanics and quantum-chemical calculations have been investigated of the spatial and electronic structures of antimicrobial tetrapeptide WRWR(Trp-Arg-Trp-Ar). Antimicrobial peptides are considered promising antibiotics due to their broad spectrum of antimicrobial properties and ability to kill drug-resistant bacteria. Conformational study of molecule was carried out on base the low-energy conformations of its monopeptides. The calculation shows the values of all intermolecular interactions between residues of optimal conformations in molecule. On the basis of obtained results have been determined the energy and electronic characteristics of tetrapeptide WRWR. Theoretical conformational analysis permit to found the forces, stabilized the energy preferable spatial structures of molecule. As a result of this study were also determined energy preferred areas of the values of dihedral angles of the backbone and side chains, values energy contributions of inter-residues interactions and hydrogen bonds, as well as orientations of the side chains in the lowest energy conformations. On base got geometry parameters were built molecular models the most stable conformations of antimicrobial tetrapeptide WRWR, which collation enables to select the structured criteria required for making medicinal preparation suitable to clinical use.

Key words: antimicrobial peptide, conformation, inhibitor, molecular mechanics method, quantum-chemical method.

АГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1, СОЕДИНЕНИЕ (+)-SKF-10047, ПОДАВЛЯЕТ ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} , ВЫЗЫВАЕМЫЙ ТАПСИГАРГИНОМ, В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бельтов М.А.³

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: l.milenina@spbu.ru, z.krutetskaya@spbu.ru

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

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

³ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

ул. Профессора Попова, 14, лит. А, г. Санкт-Петербург. 197376, РФ

Поступила в редакцию 07.07.2025

Аннотация. Депозависимый вход Ca^{2+} – универсальный механизм регулируемого входа Ca^{2+} в эукариотических клетках. Он предполагает, что вход Ca^{2+} из наружной среды активируется при опустошении внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Депозависимый вход Ca^{2+} участвует в регуляции множества клеточных процессов, таких как экзоцитоз, экспрессия генов др. В последние годы предложен новый важный участник процессов Ca^{2+} -сигналикации – сигма-1 рецепторы, представляющие собой многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны. Они располагаются в мембране эндоплазматического ретикулума; имеют уникальные свойства – историю, структуру и фармакологический профиль. Как шапероны, рецепторы сигма-1 модулируют многие клеточные процессы, в том числе процессы Ca^{2+} -сигналикации. Для выявления участия рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах и в регуляции процессов Ca^{2+} -сигналикации в макрофагах в целом, исследовано влияние избирательного агониста рецепторов сигма-1, соединения (+)-SKF-10047, на Ca^{2+} -ответы, вызываемые ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что соединение (+)-SKF-10047 значительно подавляет мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в клетки, вызываемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах. Полученные данные свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: соединение (+)-SKF-10047, рецепторы сигма-1, депозависимый вход Ca^{2+} , перитонеальные макрофаги.

Механизм депозависимого («емкостного», депо-управляемого) входа Ca^{2+} был впервые предложен Джеймсом Патни в 1986 г. С тех пор он считается универсальным механизмом входа Ca^{2+} в эукариотические клетки. Данный механизм означает, что вход Ca^{2+} активируется только при опустошении депо Ca^{2+} , расположенных внутри клетки [1,2]. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, опосредованное входом Ca^{2+} по депозависимым Ca^{2+} -каналам, регулирует разнообразные клеточные процессы, начиная от экзоцитоза и заканчивая пролиферацией. Выявлена также роль патологий депо-управляемого входа Ca^{2+} при различных заболеваниях [3,4].

Несмотря на высокую значимость депозависимого входа Ca^{2+} , конкретные молекулярные механизмы, опосредующие передачу сигнала об опустошении Ca^{2+} -депо к Ca^{2+} -каналам в плазмалемме, долгое время оставались неизвестны. В настоящее время показано, что депо-управляемый вход Ca^{2+} развивается при участии мультимолекулярного белкового комплекса (store-operated calcium influx complex, SOCIC) [5,6]. Основными участниками SOCIC служат белки STIM1 – Ca^{2+} -сенсор, расположенный в мембране депо Ca^{2+} , и белки Orai1 – Ca^{2+} -каналы, расположенные в плазмалемме. Когда Ca^{2+} выходит из депо в цитозоль (опустошение депо, фаза мобилизации Ca^{2+} из депо), сенсоры STIM1 претерпевают олигомеризацию и переносятся в участки депо, ближайшие к плазмалемме. Далее сигнал об опустошении депо передается белкам Orai1 путем прямого белок-белкового взаимодействия. После этого и развивается депозависимый вход Ca^{2+} [7-10].

Еще одним белком, выполняющим широкие регуляторные функции в клетке и до последнего времени малоизученным, является рецептор сигма-1. Согласно выполняемой ими функции, эти рецепторы относят к шаперонам. В связи с их способностью испытывать влияние со стороны множества эндогенных и экзогенных соединений, они являются в высокой степени лиганд-управляемыми. Наиболее известное место локализации сигма-1 рецепторов – мембрана эндоплазматического ретикулума. При этом чаще всего они находятся в участках, приближенных к митохондриям (так называемые МАМ – mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane) [11-15]. В процессе экзоцитоза они перемещаются в плазмалемму, где оказывают влияние на расположенные там белки – рецепторы, ионные каналы и др. Сигма-1 рецепторы присутствуют также в ядерной мембране, предположительная их роль там – участие в регуляции транскрипции [12]. Экспрессия рецепторов сигма-1 наблюдается повсеместно, и иммунные клетки, такие как макрофаги – не исключение [13,15-17].

Структура и даже классификация сигма-1 рецепторов долгое время имели спорный характер. Изначально предполагалось, что сигма-1 рецепторы относятся к опиоидным рецепторам. Однако после установления в 2016 г. их уникальной трехмерной структуры, они были выделены в отдельное семейство мембранных рецепторов [14]. Показано, что эти рецепторы являются гомотримерами. В каждом протомере содержится один трансмембранный домен. В цитоплазматических доменах каждого из протомеров присутствует β -структура, которую окружают четыре α -спирали. За связывание с лигандами отвечает межмолекулярная поверхность, располагающаяся между протомерами [14].

Как отмечалось выше, сигма-1 рецепторы обладают рядом уникальных свойств. Еще одно из них – способность взаимодействовать с большим числом лигандов, различающихся по химической структуре, механизму действия и принадлежности к определенным группам. К числу фармакологических соединений, связывающихся с сигма-1 рецепторами, относятся антидепрессанты (такие как флувоксамин, имипрамин и др.), найролептики (такие как галоперидол и хлорпромазин), анксиолитики (например, афобазол), противосудорожные препараты, противокашлевые средства (например, карбетапентан), наркотические средства (кокаин и метамфетамин) и препараты, используемые при лечении нейродегенеративных заболеваний (такие как амантадин, донепезил и др.) [18-20].

Взаимодействие сигма-1 рецепторов с рецепторами и ионными каналами модулирует многие клеточные процессы. Не остаются в стороне и процессы Ca^{2+} -сигнализации [12,14,15,21,22]. Так, в плазматической мембране сигма-1 рецепторы регулируют активность потенциалзависимых Na^+ - Ca^{2+} -, и K^+ -каналов, Ca^{2+} -каналов TRPA1, TRPV1 и TRPM8, NMDA-рецепторов, рецепторов, связанных с G-белками (мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, μ -опиоидных и D1- и D2-дофаминовых рецепторов), рецепторов с собственной тирозинкиназной активностью и др. [12,14–16,23–25]. Находящиеся в мембране эндоплазматического ретикула, рецепторы сигма-1 могут оказывать прямое влияние на процессы Ca^{2+} -сигнализации [26]. Там они взаимодействуют с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 3-го типа, сенсором Ca^{2+} в депо STIM1, а также с еще одним белком-шапероном – BiP (binding immunoglobulin protein) [27]. Рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата – непосредственный участник мобилизации Ca^{2+} из депо. Таким образом, взаимодействуя с ним, сигма-1 рецепторы регулируют процесс опустошения Ca^{2+} -депо, а, следовательно, и депо-управляемый вход Ca^{2+} из наружной среды [27-31]. Однако, распространенность этого регуляторного влияния, а также степень его необходимости для развития нормального депо-управляемого входа Ca^{2+} в различных клетках, остаются не до конца изученными.

В связи с вышесказанным, представлялось целесообразным исследовать участие рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Для проведения фармакологического анализа использовали высокоселективный агонист рецептора сигма-1 соединение (+)-SKF-10047 – (+)-N-аллилнорметазоцина гидрохлорид, аллазацин, синтетический опиоидный анальгетик, относящийся к бензоморфановому семейству и имеющий нейротропный и анальгетический эффекты [11,32-35]. Исследовали влияние (+)-SKF-10047 на Ca^{2+} -ответы, вызываемые ингибитором Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином [36], в макрофагах.

Методика. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20-22°C через 1-2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов, а также автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны нами ранее [37]. В качестве флуоресцентного зонда для регистрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Флуоресценцию объекта возбуждали при длинах волн 340 и 380 нм. Эмиссия регистрировалась на длине волны 510 нм. Изменения проводили через каждые 20 с, чтобы избежать фотовыгорания. Длительность облучения объекта составляла 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [38]. Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента. Достоверными считали различия при $P \leq 0,05$. На рисунке приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [39,40].

Результаты. Контрольные эксперименты. При добавлении 0,5 мкМ тапсигаргина к макрофагам в номинально бескальциевой среде, развивается увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – мобилизация Ca^{2+} из депо (рис. 1а). Среднее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ составляло 52 ± 11 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$). Последующее добавление 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду приводит к депозависимому входу Ca^{2+} из наружной среды в цитозоль (рис. 1а). При этом увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ составляло 132 ± 19 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$).

Эксперименты по влиянию (+)-SKF-10047 на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином в макрофагах. Клетки инкубировали в присутствии 50 мкМ (+)-SKF-10047 в течение 20 мин, затем добавляли в наружную среду 0,5 мкМ тапсигаргина (рис. 1б). При этом наблюдалось значительное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, вызванного тапсигаргином – фазы опустошения депо (на $65,3 \pm 9,1\%$, $n = 7$; $P < 0,05$) и депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги (на $73,2 \pm 9,8\%$, $n = 7$; $P < 0,05$). Данные подтверждают участие сигма-1 рецепторов в активации индуцированного тапсигаргином депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

Как видно из рисунка 1а, депо-управляемый вход Ca^{2+} имеет стационарную фазу – после повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ держится примерно на одном уровне. Это – так называемая фаза плато Ca^{2+} -ответа. Показано, что, если 50 мкМ (+)-SKF-10047 добавлено во время фазы плато депо-управляемого входа Ca^{2+} , то также наблюдается

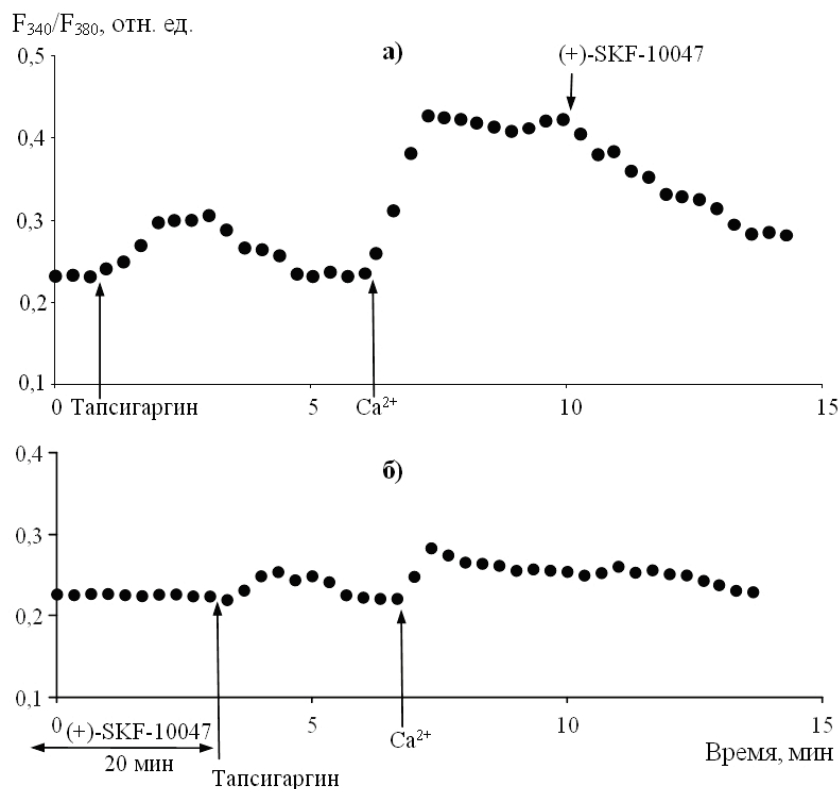


Рисунок 1. Влияние соединения (+)-SKF-10047 на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время (мин). *а* – к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, добавляли 0,5 мкМ тапсигаргина, затем индуцировали вход Ca^{2+} введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 50 мкМ (+)-SKF-10047; *б* – макрофаги, находящиеся в бескальциевой среде, преинкубировали в течение 20 мин с 50 мкМ (+)-SKF-10047, после чего добавляли 0,5 мкМ тапсигаргина, затем инициировали вход Ca^{2+} введением 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду. Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6-8 независимых экспериментов

существенное (на $70,2 \pm 8,9\%$, $n = 12$; $P < 0,05$) подавление входа Ca^{2+} в макрофаги (рис. 1а). Поскольку ранее вход Ca^{2+} уже был активирован опустошением депо, то данное ингибирование депо-управляемого входа при добавлении (+)-SKF-10047, не может быть связано с нарушением взаимодействия сигма-1 рецепторов с белками, отвечающими за фазу мобилизации Ca^{2+} из депо. Таким образом, можно сделать вывод, что сигма-1 рецепторы участвуют не только в активации, но и в поддержании депо-управляемого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги. Возможно, они регулируют поддержание депо-управляемого входа Ca^{2+} , взаимодействуя с Ca^{2+} -каналами Orai1 в плазмалемме.

Таким образом, впервые показано, что селективный агонист сигма-1 рецепторов (+)-SKF-10047 существенно ингибирует Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах. Происходит выраженное подавление как фазы мобилизации Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо в клетке, так и фазы депозависимого входа Ca^{2+} из наружной среды.

Ранее нами было исследовано влияние других лигандов сигма-1 рецепторов на Ca^{2+} -ответы в макрофаги. Среди них можно выделить еще один агонист этих рецепторов – антидепрессант амитриптилин. Так, амитриптилин также подавлял депо-управляемый вход Ca^{2+} , вызываемый двумя типами агентов – ингибиторами эндоплазматических АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой, а также дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном [41]. Таким образом, результаты настоящей работы подтверждают данные, полученные нами ранее с применением другого агониста рецепторов сигма-1.

В мировой литературе присутствует немало работ, посвященных влиянию различных лигандов сигма-1 рецепторов на процессы Ca^{2+} -сигналикации. Аналогичная схема эксперимента по влиянию (+)-SKF-10047 на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином, применялась на клетках эмбриональной почти человека (линия НЕК 293) и ооцитах китайского хомячка [27]. В обоих объектах (+)-SKF-10047 также ингибировал обе фазы Ca^{2+} -ответа, вызываемого тапсигаргином.

Другие агонисты сигма-1 рецепторов оказывают сходное влияние на Ca^{2+} -сигналы в разных типах клеток. На эндотелиальных клетках сосудов мозга крыс показано, что кокаин ингибирует депо-управляемый вход Ca^{2+} [30]. В то же время, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) антидепрессант амитриптилин ингибирует и фазу мобилизации Ca^{2+} из депо, и депо-управляемый вход Ca^{2+} из наружной среды [42].

Механизм депозависимого входа Ca^{2+} является универсальным, однако в возбудимых клетках вход Ca^{2+} происходит также по потенциалзависимым Ca^{2+} -каналам. Данный тип Ca^{2+} -каналов тоже может взаимодействовать с рецепторами сигма-1. В связи с этим, влияние лигандов сигма-1 рецепторов на Ca^{2+} -токи потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов широко исследуется. В данном случае также, как правило, наблюдается подавляющий эффект на вход Ca^{2+} в клетки. Так, (+)-SKF-10047 ингибирует Ca^{2+} -каналы L-типа ($\text{Cav}1.2$) в ганглиозных клетках сетчатки крысы (линия RGC-5) [43,44] и Ca^{2+} -каналы N-типа ($\text{Cav}2.2$) в нейронах стриатума крысы [45]. Широко распространено ингибирующее влияние амитриптилина на потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы [46]. Этот фармакологический агент подавляет активность Ca^{2+} -каналов L-типа ($\text{Cav}1.2$) в миоцитах желудочка сердца крысы [47], нейронах переднего мозга крысы [48] и нейронах тройничного ганглия мыши [49], а в клетках нейробластомы (линия SH-SY5Y) он блокирует также Ca^{2+} -каналы N-типа ($\text{Cav}2.2$) [50].

Интересно, что эффект лигандов сигма-1 рецепторов на Ca^{2+} -каналы может иметь более сложный характер. Так, в симпатических и парасимпатических нейронах крысы один из специфических агонистов сигма-1 рецепторов - (+)-пентазоцин дозозависимо и обратимо уменьшает пиковую амплитуду токов через разные типы потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов (N-, L-, P/Q- и R-типов), ускоряет кинетику их инактивации и сдвигает потенциал-зависимость активации и инактивации в сторону более отрицательных потенциалов [51].

Полученные в данной работе результаты о подавлении депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином, свидетельствуют об участии сигма-1 рецепторов в модуляции депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крыс, что позволяет рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Эти рецепторы могут модулировать связывание между главными белками комплекса депозависимого входа Ca^{2+} - STIM1, расположенного в мембране эндоплазматического ретикулума, и Orai1, локализованного в плазмалемме, и, таким образом, влиять на развитие депозависимого входа Ca^{2+} [27].

Кроме того, данные настоящей работы могут содействовать расшифровке механизмов клеточного и молекулярного действия производных бензоморфана, а также разработке подходов лечения заболеваний, связанных с нарушением в структуре и функциях, сигма-1 рецепторов. Так, при нарушениях экспрессии, сигнальных функций и локализации сигма-1 рецепторов может развиваться широкий ряд заболеваний [13,15,52, 53]. Например, известна роль этих рецепторов в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, латеральный амиотрофический склероз [17,54-59]. В связи с этим, рецепторы сигма-1 могут стать одной из важных мишеней для фармакологического воздействия при лечении этих болезней. Предполагается, что агонисты сигма-1 рецепторов, включающие бензоморфановую группу ((+)-пентазоцин, (+)-SKF-10047) могут быть полезны в терапии этих синдромов [17,59].

Таким образом, полученные нами данные о подавлении агонистом рецепторов сигма-1, соединением (+)-SKF-10047, обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крыс, дополнительно подтверждают многогранность эффектов производных бензоморфана и свидетельствуют в пользу их терапевтического потенциала, как лигандов рецепторов сигма-1.

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

Список литературы / References:

1. Putney J.W. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 1990, vol. 11, pp. 611-624.
2. Putney J.W. Store-operated calcium entry: a historical overview. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, vol. 981, pp. 205-214.
3. Putney J.W. The physiological function of store-operated calcium entry. *Neurochem. Res.*, 2011, vol. 36, pp. 1157-1165.
4. Prakriya M., Lewis R.S. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.*, 2015, vol. 95, pp. 1383-1436.
5. Vaca L. SOCIC: the store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium*, 2010, vol. 47, pp. 199-209.
6. Moreno C., Vaca L. Microdomain organization of SOCE signaling. In: *Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) pathways*. Wien: Springer-Verlag, 2012, pp. 93-113.
7. Nwokonko R.M., Cai X., Loktionova N.A., Wang Y., Zhou Y., Gill D.L. The STIM-Orai pathway: conformational coupling between STIM and Orai in the activation of store-operated Ca^{2+} entry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, vol. 993, pp. 83-98.
8. Nguyen N.T., Han W., Cao W.-M., Wang Y., Wen S., Huang Y., Li M., Du L., Zhou Y. Store-operated calcium entry mediated by Orai and STIM. *Comprehensive Physiol.*, 2018, vol. 8, pp. 981-1002.
9. Lunz V., Romanin C., Frischauf I. STIM1 activation of Orai1. *Cell Calcium*, 2019, vol. 77, pp. 29-38.
10. Rubaiy H.N. ORAI calcium channels: regulation, function, pharmacology, and therapeutic targets. *Pharmaceuticals*, 2023, vol. 16, p. 162, doi: 10.3390/ph16020162.
11. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, vol. 31, pp. 557-566.
12. Su T.-P., Su T.-C., Nakamura Y., Tsai S.-Y. The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2016, vol. 37, no. 4, pp. 262-278.

13. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σ R]: Biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 2016, vol. 36, no. 4, pp. 327-388.
14. Schmidt H.R., Kruse A.C. The molecular function of σ receptors: past, present, and future. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, vol. 40, no. 9, pp. 636-654.
15. Aishwarya R., Abdullah C.S., Morshed M., Remex N.S., Bhuiyan M.S. Sigmar1's molecular, cellular, and biological functions in regulating cellular pathophysiology. *Front. Physiol.*, 2021, vol. 12, 705575, doi: 10.3389/fphys.2021.705575.
16. 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. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, p. 1997, doi: 10.3390/ijms24031997.
17. Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.*, 2018, vol. 16, pp. 97-116.
18. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendan C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.*, 2008, vol. 6, no. 4, pp. 344-366.
19. Maurice T., Su T.-P. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol. Ther.*, 2009, vol. 124, no. 2, pp. 195-206.
20. Chu U.B., Ruoho A.E. Biochemical pharmacology of the sigma-1 receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2016, vol. 89, pp. 142-153.
21. Pontisso I., Combettes L. Role of sigma-1 receptor in calcium modulation: possible involvement in cancer. *Genes*, 2021, vol. 12, no. 2, p. 139, doi: 10.3390/genes12020139.
22. Shi M., Chen F., Chen Z., Yang W., Yue S., Zhang J., Chen X. Sigma-1 receptor: a potential therapeutic target for traumatic brain injury. *Front. Cell. Neurosci.*, 2021, vol. 15, p. 685201, DOI: 10.3389/fncel.2021.685201.
23. Ortiz-Renteria M., Juarez-Contreras R., Gonzalez-Ramirez R., Islas L. D., Sierra-Ramirez F., Llorente I. et al. TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2018, vol. 115, pp. E1657-E1666, doi: 10.1073/pnas.1715972115.
24. Morales-Lazaro S.L., Gonzalez-Ramirez R., Rosenbaum T. Molecular interplay between the sigma-1 receptor, steroids, and ion channels. *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, p. 419, DOI: 10.3389/fphar.2019.00419.
25. Cortes-Montero E., Sanchez-Blazquez P., Onetti Y., Merlos M., Garzon J. Ligands exert biased activity to regulate sigma 1 receptor interactions with cationic TRPA1, TRPV1 and TRPM8 channels. *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, p. 634, DOI: 10.3389/fphar.2019.00634.
26. Hayashi T., Su T.-P. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{2+} signaling and cell survival. *Cell*, 2007, vol. 131, pp. 596-610.
27. Srivats S., Balasuriya D., Pasche M., Vistal G., Edwardson J.M., Taylor C.W., Murrell-Lagnado R.D. Sigma 1 receptors inhibit store-operated Ca^{2+} entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. *J. Cell Biol.*, 2016, vol. 213, no. 1, pp. 65-79.
28. Hayashi T., Maurice T., Su T.-P. Ca^{2+} signalling via σ_1 -receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca^{2+} concentration. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 2000, vol. 293, pp. 788-798.
29. Monnet F.P. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca^{2+} : clinical and therapeutic relevance. *Biol. Cell.*, 2005, vol. 97, pp. 878-883.
30. Brailoiu G.C., Deliu E., Console-Bram L.M., Soboloff J., Abood M.E., Unterwald E.M., Brailoiu E. Cocaine inhibits store-operated Ca^{2+} entry in brain microvascular endothelial cells: Critical role for sigma-1 receptors. *Biochem. J.*, 2016, vol. 473, pp. 1-5.
31. Berlansky S., Humer C., Sallinger M., Frischauf I. More than just simple interaction between STIM and Orai proteins: CRAC channel function enabled by a network of interactions with regulatory proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 471, doi: 10.3390/ijms22010471.
32. Navarro J.F., Beltran D., Cavas M. Effects of (+) SKF 10,047, a sigma-1 receptor agonist, on anxiety, tested in two laboratory models in mice. *Psicothema*, 2012, vol. 24, pp. 427-430.
33. Couly S., Yasui Y., Foncham S., Grammatikakis I., La A., Shi L., Su T.-P. Benzomorphan and non-benzomorphan agonists differentially alter sigma-1 receptor quaternary structure, as does types of cellular stress. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2024, vol. 81:14, doi: 10.1007/s00018-023-05023-z.
34. Pasternak G.W., Carroll-Buatti M., Spiegel K. The binding and analgesic properties of a sigma opiate, SKF 10,047. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1981, vol. 219, pp. 192-198.
35. Lysko P.G., Gagnon R.C., Yue T.L., Gu J.L., Feuerstein G. Neuroprotective effects of SKF 10,047 in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia. *Stroke*, 1992, vol. 23, pp. 414-419, doi: 10.1161/01.str.23.3.414.
36. Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O., Foder B., Cullen P.J., Drobak B.K., Bjerrum P.J., Christensen S.B., Hanley M.R. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*, 1989, vol. 27, pp. 17-23.
37. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты подавляют Ca^{2+} ответы, вызываемые трифлуоперазином, в макрофагах. *Цитология*, 2018, т. 60, № 2, с. 116-121 [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Arachidonic acid metabolism inhibitors attenuate Ca^{2+} responses induced by trifluoperazine in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 315-322 (In Russ.)].

38. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
39. Bruce J.I.E., Elliott A.C. Pharmacological evaluation of the role of cytochrome P450 in intracellular calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Brit. J. Physiol.*, 2000, vol. 131, pp. 761-771.
40. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566, doi: 10.1074/jbc.M109518200.
41. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И. Трициклический антидепрессант амитриптилин подавляет Ca^{2+} -ответы в перитонеальных макрофагах крысы. *Цитология*, 2024, т. 66, № 2, с. 161-172 [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I. Tricyclic antidepressant amitriptyline suppresses Ca^{2+} responses in rat peritoneal macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2024, vol. 18, no. 4, pp. 439-450, DOI: 10.1134/S1990519X24700378 (In Russ.)].
42. Harper J.L., Daly J.W. Inhibitors of store-operated calcium channels: Imidazoles, phenothiazines, and other tricyclics. *Drug Dev. Res.*, 1999, vol. 47, pp. 107-117.
43. Tchedre K.T., Huang R.Q., Dibas A., Krishnamoorthy R.R., Dillon G.H., Yorio T. Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008, vol. 49, pp. 4993-5002, doi: 10.1167/iovs.08-1867.
44. Mueller B.H., Park Y., Daudt D.R., Ma H.-Y., Akopova I., Stankowska D.L., Clark A.F., Yorio T. Sigma-1 receptor stimulation attenuates calcium influx through activated L-type voltage gated calcium channels in purified retinal ganglion cells. *Exper. Eye Res.*, 2013, vol. 107, p. 21e31, doi: 10.1016/j.exer.2012.11.002.
45. Zhang K., Zhao Z., Lan L., Wei X., Wang L., Liu X., Yan H., Zheng J. Sigma-1 receptor plays a negative modulation on N-type calcium channel. *Front. Pharmacol.*, 2017, vol. 8, p. 302, doi: 10.3389/fphar.2017.00302.
46. Lavoie P.A., Beauchamp G., Elie R. Tricyclic antidepressants inhibit voltage-dependent calcium channels and Na^{+} - Ca^{2+} exchange in rat brain cortex synaptosomes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1990, vol. 68, pp. 1414-1418, doi: 10.1139/y90-215.
47. Zahradnik I., Minarovic I., Zahradnikova A. Inhibition of the cardiac L-Type calcium channel current by antidepressant drugs. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 2008, vol. 324, pp. 977-984, doi: 10.1124/jpet.107.132456.
48. Bang E., Tobery A., Montgomery K.S., Fincher A.S., Earnest D.J., Murchison D.A., Griffith W.H. Amitriptyline decreases GABAergic transmission in basal forebrain neurons using an optogenetic model of aging. *Front. Aging Neurosci.*, 2021, vol. 13, p. 673155, DOI: 10.3389/fnagi.2021.673155.
49. Wu W., Ye Q., Wang W., Yan L., Wang Q., Xiao H., Wan Q. Amitriptyline modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in mouse trigeminal ganglion neurons. *Neurosci. Lett.*, 2012, vol. 506, pp. 307-311, doi: 10.1016/j.neulet.2011.11.031.
50. Cardoso F.C., Schmit M., Kuiper M.J., Lewi R.J., Tuck K.L., Duggan P.J. Inhibition of N-type calcium ion channels by tricyclic antidepressants – experimental and theoretical justification for their use for neuropathic pain. *RSC Med. Chem.*, 2022, vol. 13, pp. 183-195, doi: 10.1039/d1md00331c.
51. Zhang H., Cuevas J. Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. *J. Neurophysiol.*, 2002, vol. 87, pp. 2867-2879.
52. Pergolizzi J., Varrassi G., Coleman M., Breve F., Christo D.K., Christo P.J., Moussa Ch. The Sigma Enigma: A narrative review of sigma receptors. *Cureus*, 2023, vol. 15, no. 3, p. e35756, doi: 10.7759/cureus.35756.
53. Tsai S.-Y., Hayashi T., Mori T., Su T.-P. Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 2009, vol. 9, no. 3, pp. 184-189.
54. Tsai S.-Y., Pokrass M.J., Klauer N.R., De Credico N.E., Su T.-P. Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2014, vol. 18, no. 12, pp. 1461-1476.
55. Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. Neuronal sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.*, 2019, vol. 13, p. 862, doi: 10.3389/fnins.2019.00862.
56. Yang K., Wang C., Sun T. The roles of intracellular chaperone proteins, sigma receptors, in Parkinson's disease (PD) and major depressive disorder (MDD). *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, p. 528, doi: 10.3389/fphar.2019.00528.
57. Herrando-Grabulosa M., Gaja-Capdevila N., Vela J.M., Navarro X. Sigma 1 receptor as a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis. *Br. J. Pharmacol.*, 2020, vol. 178, no. 6, pp. 1336-1352.
58. Lachance V., Belanger S.-M., Hay C., Le Corvec V., Banouong V., Lapalme M., Tarmoun K., Beaucaire G., Lussier M.P., Kourrich S. Overview of Sigma-1R subcellular specific biological functions and role in neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, p. 1971, doi: 10.3390/ijms24031971.
59. Malar D.S., Thitilertdech P., Ruckvongacheep K.S., Brimson S., Tencomnao T., Brimson J.M. Targeting sigma receptors for the treatment of neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *CNS Drugs*, 2023, vol. 37, pp. 399-440, doi: 10.1007/s40263-023-01007-6.

SIGMA-1 RECEPTOR AGONIST, COMPOUND (+) - SKF-10047, SUPPRESSES STORE-OPERATED Ca^{2+} ENTRY, INDUCED BY THAPSIGARGIN, IN PERITONEAL MACROPHAGES**Milenina L.S.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Beltov M.A.³**¹ Saint-Petersburg State University*Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia; e-mail: l.milenina@spbu.ru, z.krutetskaya@spbu.ru*² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University*Litovskaya str., 2, Saint-Petersburg, 194100, Russia*³ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University*Professor Popov str., 14, lit. A, Saint-Petersburg, 197376, Russia*

Received 07.07.2025

Abstract. Store-operated Ca^{2+} entry is a universal mechanism of regulated Ca^{2+} entry in eukaryotic cells. It assumes that Ca^{2+} entry from the external environment is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. Store-operated Ca^{2+} entry is involved in the regulation of many cellular processes, such as exocytosis, gene expression, etc. In recent years, a new important participant in Ca^{2+} signaling processes has been proposed - sigma-1 receptors, which are multifunctional ligand-regulated molecular chaperones. They are located in the membrane of the endoplasmic reticulum; they have unique properties - history, structure, and pharmacological profile. As chaperones, sigma-1 receptors modulate many cellular processes, including Ca^{2+} signaling processes. To reveal the involvement of sigma-1 receptors in the regulation of store-operated Ca^{2+} entry into macrophages and in the regulation of Ca^{2+} signaling processes in macrophages in general, the effect of the selective agonist of sigma-1 receptors, compound (+)-SKF-10047, on Ca^{2+} responses induced by the endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitor thapsigargin in rat peritoneal macrophages was studied. Using the fluorescent Ca^{2+} probe Fura-2AM, it was shown for the first time that compound (+)-SKF-10047 significantly suppresses Ca^{2+} mobilization from intracellular Ca^{2+} stores and subsequent store-operated Ca^{2+} entry into cells induced by thapsigargin in peritoneal macrophages. The data obtained indicate the participation of sigma-1 receptors in the regulation of store-operated Ca^{2+} entry in macrophages and allow us to consider sigma-1 receptors as a new regulatory component of the signaling complex of store-operated Ca^{2+} entry in macrophages.

Key words: compound (+)-SKF-10047, sigma-1 receptors, store-operated Ca^{2+} entry, peritoneal macrophages.

ПРОГРАММА ДЛЯ ОБРАБОТКИ ИТОГА СКАНИРОВАНИЯ МЫШЛЕНИЯ ЦЕПНЫМ ВЕРБАЛЬНЫМ ТЕСТОМ

Лесных В.Н., Елистратов А.В., Коломбет В.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
ул. Институтская, 3, г. Пущино, 3142290, РФ; e-mail: 1253vadim@mail.ru

Поступила в редакцию 11.07.2025

Аннотация. Мышление человека представляет значительный научный и практический интерес. «Внимание» и «настроение», традиционно считавшиеся трудно формализуемыми понятиями, оказались главными для описания процесса мышления. Согласно 30-летним результатам нашей исследовательской группы основой процесса мышления является взаимодействие двух известных систем внимания – дорзальной (DAN, dorsal attention network) и вентральной (VAN, ventral attention network). Для отслеживания тесно взаимосвязанного функционирования этой пары систем и анализа их роли в процессе мышления применён созданный нами ассоциативный цепной вербальный (словесный) тест (ЦВТ), позволяющий изучать динамику когнитивных процессов. При выполнении ЦВТ сначала выбирается (и записывается) любое случайное слово и к нему выписываются ассоциации в форме серии слов. Это этап DAN. Последнее записанное слово немедленно выбирается в роли нового «случайного слова», момент переключения к началу генерации следующей серии ассоциаций играет роль этапа VAN. Итогом ЦВТ является текст – серия серий ассоциаций. По времени он обычно занимает от 10 минут до получаса. В статье представлена компьютерная программа для автоматизированной интерпретации результатов теста, основанная на средствах обработки естественного языка (NLP – natural language processing). Тест демонстрирует закономерные дискретные изменения настроения, сопровождающие процесс мышления. Текст теста распадается на четвёрки серий ассоциаций и, соответственно, на четвёрки чисел, полученных при NLP. Сравнив их с шаблонами, программа восстанавливает циклическую картину – ментальную траекторию движения по стандартному «каркасу» мышления, модулированную изменяющимся настроением.

Ключевые слова: цепной вербальный тест, DAN, дорзальная сеть внимания, VAN, вентральная сеть внимания, дискретные серии настроения, внимание, настроение.

ВВЕДЕНИЕ

Различные методы исследования мышления предоставляют уникальные данные и открывают разнообразные перспективы. Выяснилось, что для изучения основ мышления можно использовать традиционные психологические методы, обходясь без сложных нейробиологических методик (ЭЭГ, фМРТ, ТМС). Остаются традиционные психологические методы – тестирование, наблюдение и эксперимент, а также когнитивный анализ речи с применением современных компьютерных технологий.

Мы предположили, что механизм мышления тесно связан с функционированием двух систем внимания, реализованных через дорзальную (DAN) и вентральную (VAN) сети в головном мозге [1]. Для изучения эффектов, возникающих в процессе мышления вследствие работы систем DAN и VAN, применяется ассоциативный цепной вербальный (словесный) тест (ЦВТ) [2]. Выявлено, что выполнение ЦВТ сопровождается дискретными изменениями настроения, возникающими после каждого цикла попеременной активности систем DAN и VAN. Для интерпретации результатов ЦВТ разработаны специальные программы, которые позволяют выявить спектр настроений и представить его в виде стандартной дискретной серии, обычно состоящей из восьми значений. Понятия «внимание» и «настроение», ранее считавшиеся трудно формализуемыми, доказали свою ключевую роль в описании процесса мышления.

Это находка позволяет в перспективе использовать результаты ЦВТ в качестве дополнительного метода для профессиональных медиков при постановке диагноза на основе выявленных особенностей мышления. Актуальность метода обусловлена необходимостью совершенствования диагностики: создания нового подхода в психоанализе для получения экспериментальных данных и разработки методик, позволяющих сформировать целостную картину функционирования мышления, что может скорректировать традиционные представления о когнитивных процессах (рис. 1).

При выборе методологии для анализа механизма мышления через выполнение ЦВТ применяется подход, сочетающий экспериментальные, статистические и вычислительные методы для интерпретации полученных результатов. Во время эксперимента волонтеру предлагается выполнить цепной вербальный тест, начиная с произвольного слова, после чего он выписывает цепь ассоциаций к этому слову, а по завершении выписывает цепь ассоциаций к последнему записанному слову. Наши наблюдения показали, что выписывание серии ассоциаций к слову, ставшему объектом внимания, поддерживает состояние DAN, после чего внимание переключается, случается резкий переход (срыв DAN), происходит кратковременное включение системы VAN, и далее процесс DAN-VAN повторяется циклически: DAN-VAN-DAN-VAN -... Каждый тест занимает не более

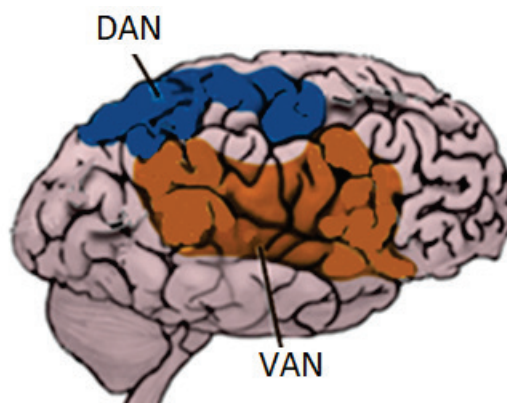


Рисунок 1. Схематическое расположение дорзальной сети внимания (DAN – dorsal attention network), «внутреннего», когнитивного внимания, управляемого сознанием, а также вентральной сети внимания (VAN – ventral attention network), «внешнего» внимания, управляемого стимулами

получаса, затем каждая такая серия цепей ассоциаций анализируется для вычисления т.н. полярности и тональности, и результаты объединяются в интегральный числовой показатель настроения. Этот показатель отражает окраску ассоциаций, обобщённое эмоциональное состояние, настроение. При компьютерной обработке результата теста применяются инструменты обработки естественного языка (NLP), такие как `spacytextblob` и `VADER` с использованием языка Python.

Целью статьи является анализ особенностей функционирования парной системы внимания (DAN и VAN) в головном мозге посредством ЦБТ, а также представление программы для автоматизированной интерпретации результатов теста. В процессе работы был уточнён алгоритм проведения ЦБТ, сформированы группы волонтеров, что обеспечило быстрый цикл тестирования и обработки результатов. Использование популярного языка программирования Python позволило существенно ускорить автоматизацию анализа и обеспечить качественную визуализацию хода мыслительного процесса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ниже подробно описана программа для автоматизированного анализа результатов тестирования. Тестирование можно пройти, например, на сайте golosaVgolove.ru, где волонтеру помимо ответа предоставляется текст его теста для параллельных (при желании) самостоятельных вычислений на компьютере (см. [3-8]). Поскольку информация на сайтах зачастую доступна лишь ограниченное время, программа изложена в достаточной детализации, чтобы её можно было скопировать прямо из текста статьи и использовать на практике.

```
# ЦБТ №729
#!/usr/bin/env python3
import spacy
from spacytextblob.spacytextblob import SpacyTextBlob
import nltk
from nltk.sentiment.vader import SentimentIntensityAnalyzer
import pandas as pd

# Если требуется, загрузить словарь VADER (если ещё не загружен)
nltk.download('vader_lexicon')

#####
# Модуль 1. Анализ тональности с использованием textBlob (spacytextblob)
#####

# Загрузка модели spaCy и добавление компонента TextBlob
nlp = spacy.load('en_core_web_sm')
nlp.add_pipe('spacytextblob')
# textEn - результат перевода текста теста на английский язык, где уже созданы используемые методы NLP.
textEn = ""
"impulse: effort, physics, pulse, pe, em, push.",
"push: toilet, kick, pusher, core, push the car.",
"push the car: help, force, energy, stuck car, push the motorcycle.",
"push the motorcycle: bike, wet, motorcycle, moped, tillerblock.",
"tillerblock: cottage, house in the village, mowing, trimmer, benzotrimmer.",
"benzotrimmer: gasoline, scythe, fishing line, grass, smells.",
```

"smells: perfume, cologne, stink, Red Moscow, Consul.",
 "Consul: temporary-attorney, attache, official, representative, ambassador.",
 "ambassador: Thailand, Russia, USA, secret agent, intelligence officer.",
 "intelligence officer: intelligence, counter-intelligence, Vladimir Bogdanovich Rezun, Viktor Suvorov.",
 "Viktor Suvorov: Aquarium, Icebreaker, Special Forces, Day-M.",
 "Day-M.: day, new day, day-day, Mikhail Boyarsky, date of the beginning of the war.",
 "date of the beginning of the war: June 22, date of the end of the war, Germany, Japan, Richard Sorge.",
 "Richard Sorge: predictor, scout, genius, forecaster, smartass.",
 "smartass: knowledgeable, conceited, know-it-all, smart man, smart girl.",
 "smart girl: stupid, talent, talented man, smart guy, five-year-old.",
 "five-year-old: excellent student, school student, student, graduate student, applicant.",
 "applicant: Candidate of Sciences, Doctor of Sciences, Master's degree, bachelor's degree, diploma.",
 "diploma holder: diploma, university, high school, high school, protected.",
 "protected: unprotected, diploma protection, protection, protected from the sun, invulnerable.",
 "invulnerable: strong, thick-skinned, durable, sunscreen, non-stick.",
 "non-stick: non-stick, frying pan, pan, cleanliness, pure tide.",
 "pure tide: descaling agent, washing machine, dishwasher, water, washing powder.",
 "washing powder: Tide, Percale, bed sheet."
 ""

Разбиваем исходный текст на строки (предполагается, что каждая строка – отдельная серия)
 sentences = [line.strip() for line in textEn.strip().split("\n") if line.strip()]

```
print("=== TextBlob Analysis Results ===")
textBlob_results = []
for sentence in sentences:
    doc = nlp(sentence)
    polarity = doc._polarity
    # Используем часть строки до двоеточия как метку
    label = sentence.split(':')[0]
    print(f'{label}: {polarity}')
    textBlob_results.append(polarity)
```

```
#####
# Модуль 2. Анализ тональности с использованием VADER
#####
```

```
sid = SentimentIntensityAnalyzer()
```

```
print("\n=== VADER Analysis Results ===")
vader_results = []
for sentence in sentences:
    ss = sid.polarity_scores(sentence)
    compound = ss['compound']
    print(f'{sentence.split(':')[0]}: {compound}')
    vader_results.append(compound)
```

```
# Проверка: число результатов должно совпадать
if len(textBlob_results) != len(vader_results):
    print("Внимание: число оценок TextBlob и VADER не совпадает!")
```

```
#####
# Модуль 3. Сглаживание и объединение результатов, и после вычитания среднего значения сохранение в Excel
#####
```

```
# Создаем DataFrame с результатами
data = {
    'VADERcompound': vader_results,
    'textBlob': textBlob_results
}
df = pd.DataFrame(data)
```

```
# Функция симметричного фильтра первых разностей
```

```

def symmetric_filter(data_list):
    n = len(data_list)
    smoothed = []
    if n < 2:
        return data_list
    # Первый элемент
    smoothed.append(0.5 * data_list[0] + 0.5 * data_list[1])
    # Промежуточные элементы
    for i in range(1, n - 1):
        smoothed.append(0.25 * data_list[i - 1] + 0.5 * data_list[i] + 0.25 * data_list[i + 1])
    # Последний элемент
    smoothed.append(0.5 * data_list[n - 2] + 0.5 * data_list[n - 1])
    return smoothed

# Функция двойного сглаживания
def apply_double_smoothing(data_list):
    first = symmetric_filter(data_list)
    second = symmetric_filter(first)
    return first, second

# Применяем двойное сглаживание для каждой серии оценок
VADER_first, VADER_second = apply_double_smoothing(df['VADERcompound'].tolist())
textBlob_first, textBlob_second = apply_double_smoothing(df['textBlob'].tolist())

# Вычисляем итоговую серию – полусумму двух сглаженных массивов с округлением
#combined_halfsum = [round((a + b) / 2, 2) for a, b in zip(VADER_second, textBlob_second)]
combined_halfsum = [round((0.75*a + 0.25*b), 2) for a, b in zip(VADER_second, textBlob_second)]
df['combined_halfsum'] = combined_halfsum

mean_combined = sum(combined_halfsum) / len(combined_halfsum)

# Создаем скорректированную серию, вычитая среднее значение из каждого элемента
adjusted_series = [round(value - mean_combined, 2) for value in combined_halfsum]

# Создаем DataFrame с результатами и добавляем скорректированную серию
df['adjusted_series'] = adjusted_series

# Сохраняем скорректированную серию в Excel
output_excel_path_adjusted = 'output_adjusted_series.xlsx'
df.to_excel(output_excel_path_adjusted, index=False)

print("\n=== Adjusted Series ===")
print(adjusted_series)

combined_halfsum = adjusted_series

# Сохраняем результаты в Excel (при необходимости скорректируйте путь)
#output_excel_path = 'output_combined_halfsum.xlsx'
#df.to_excel(output_excel_path, index=False)

#print("\n=== Combined Halfsum after Double Smoothing ===")
#print(combined_halfsum)
#print("\nDataFrame:")
#print(df)

#####
# Модуль 4. Разбиение на финального списка на фрагменты по 4 числа и автоматический подбор шаблонов к ним
#####

# Определяем шаблоны
warm_pair = [
    [0.0, 0.25, 0.40, 0.30],

```

```

    [0.30, 0.40, 0.25, 0.0]
]
cold_pair = [
    [0.0, -0.25, -0.40, -0.30],
    [-0.30, -0.40, -0.25, 0.0]
]
all_templates = warm_pair + cold_pair

def sum_of_absolute_differences(fragment, template):
    return sum(abs(f - t) for f, t in zip(fragment, template))

def find_fragments(series):
    fragments = []
    # Обработываем 4 этапа с разными сдвигами (0, 1, 2, 3)
    for start in range(4):
        current_fragments = []
        prev_template = None # Для стыковки фрагментов
        for i in range(start, len(series) - 3, 4):
            fragment = series[i:i+4]
            fragment_number = i // 4 + 1
            if prev_template is not None:
                candidate_templates = [
                    template for template in all_templates
                    if (template[0] == prev_template[-1] or (abs(prev_template[-1]) == 0.30 and abs(template[0]) == 0.30))
                ]
                if candidate_templates:
                    best_template = min(candidate_templates, key=lambda t: sum_of_absolute_differences(fragment, t))
                    best_diff = sum_of_absolute_differences(fragment, best_template)
                else:
                    best_template = min(all_templates, key=lambda t: sum_of_absolute_differences(fragment, t))
                    best_diff = sum_of_absolute_differences(fragment, best_template)
            else:
                best_template = min(all_templates, key=lambda t: sum_of_absolute_differences(fragment, t))
                best_diff = sum_of_absolute_differences(fragment, best_template)
            current_fragments.append((fragment, fragment_number, best_template, best_diff))
            prev_template = best_template
        fragments.append(current_fragments)
    return fragments

# В качестве исходного ряда используем итоговую серию, полученную на предыдущем этапе
main_series = combined_halfsum

result_fragments = find_fragments(main_series)

print("\n=== Fragment Analysis Results ===")
for stage_index, fragments in enumerate(result_fragments):
    print(f"\nStage {stage_index+1}:")
    sum_diff = 0
    count = 0
    for frag, frag_number, template, diff in fragments:
        frag_str = ', '.join(f"{x:.2f}" for x in frag)
        template_str = ', '.join(f"{x:.2f}" for x in template)
        print(f"Fragment {frag_number} (values: {frag_str}) | Template: {template_str} | Sum of absolute differences: {diff:.2f}")
        sum_diff += diff
        count += 1
    if count > 0:
        avg_diff = sum_diff / count
        print(f"Average sum of absolute differences for Stage {stage_index+1}: {avg_diff:.2f}")

```

Комментарий: во-первых, программа работает с английскими словами, для которых создана соответствующая база данных. Поэтому тест может быть изначально составлен на любом языке, но затем его необходимо перевести на английский для корректной обработки. Во-вторых, программа полностью

автоматизирует обработку результатов теста, обеспечивая однозначное соответствие входных и выходных данных. В Модулях 1 и 2 рассчитываются две характеристики – полярность и тональность – которые не идентичны, хотя и сходны, и определяются в тестировании для каждой серии ассоциаций (состояния DAN). Комбинированный показатель, полученный в Модуле 3 (с весами 0.25 и 0.75 для соответствующих методов), отражает оценку настроения волонтера. В Модуле 3 также осуществляется двукратное сглаживание результатов, после чего финальный список сохраняется в файле output_combined_halfsum.xlsx. В примере №729 это серия: -0,09, -0,06, -0,02, -0,06, -0,14, -0,21, -0,23, -0,11, 0,11, 0,24, 0,14, -0,14, -0,3, -0,11, 0,23, 0,41, 0,32, 0,09, -0,02, 0,04, 0,09, 0,03, -0,06, -0,1. На основе финального списка можно построить сглаженный график динамики настроения во время тестирования (см. рис. 2). В Модуле 4 определены шаблоны, и проводится серия попыток сопоставить их с кривой настроения, разместив шаблоны вдоль неё. Итог работы Модуля 4 сводится к серии этапов, из которых выбирается тот, где невязка (суммарная разница между фрагментами и шаблонами) минимальна. В примере №729 это четыре этапа:

Этап 1: при начале разбиения с 1-го элемента (в данном примере, -0,09) средняя сумма модулей разницы составит 0.74.

Этап 2: при начале разбиения со 2-го элемента (в данном примере, -0,06) средняя сумма модулей разницы составит 0.84.

Этап 3: при начале разбиения с 3-го элемента (в данном примере, -0,02) средняя сумма модулей разницы составит **0.62**:

Fragment 1 (values: -0.02, -0.06, -0.14, -0.21) | Template: 0,00, -0,25, -0,40, -0,30 | Sum of absolute differences: 0,56

Fragment 2 (values: -0,23, -0,11, 0,11, 0,24) | Template: -0,30, -0,40, -0,25, 0,00 | Sum of absolute differences: 0,96

Fragment 3 (values: 0,14, -0,14, -0,30, -0,11) | Template: 0,00, -0,25, -0,40, -0,30 | Sum of absolute differences: 0,54

Fragment 4 (values: 0,23, 0,41, 0,32, 0,09) | Template: 0,30, 0,40, 0,25, 0,00 | Sum of absolute differences: 0,24

Fragment 5 (values: -0,02, 0,04, 0,09, 0,03) | Template: 0,00, 0,25, 0,40, 0,30 | Sum of absolute differences: 0,81

Этап 4: при начале разбиения с 4-го элемента (в данном примере, -0,06) средняя сумма модулей разницы составит 0,72.

Сумма модулей разности (минимальная невязка) является количественным показателем сходства фрагмента с максимально соответствующим шаблоном. В данном примере наилучшее сходство наблюдается на третьем этапе. Для улучшения визуализации шаблоны окрашиваются стандартным способом, и аналогичная цветовая схема применяется к элементам фрагментов и к точкам в Excel-графике. Итог работы программы, построенный в Excel, представлен на рисунке 2:

См. диаграмму рисунке 3 для дальнейшей визуализации результатов ЦВТ №729.

Визуализация результатов подтверждает наличие в ходе теста циклических изменений настроения (рис. 3, 4), что указывает на фундаментальные особенности работы когнитивного процесса, в частности, на сканирующую динамику взаимодействия систем DAN и VAN в рамках процесса мышления.

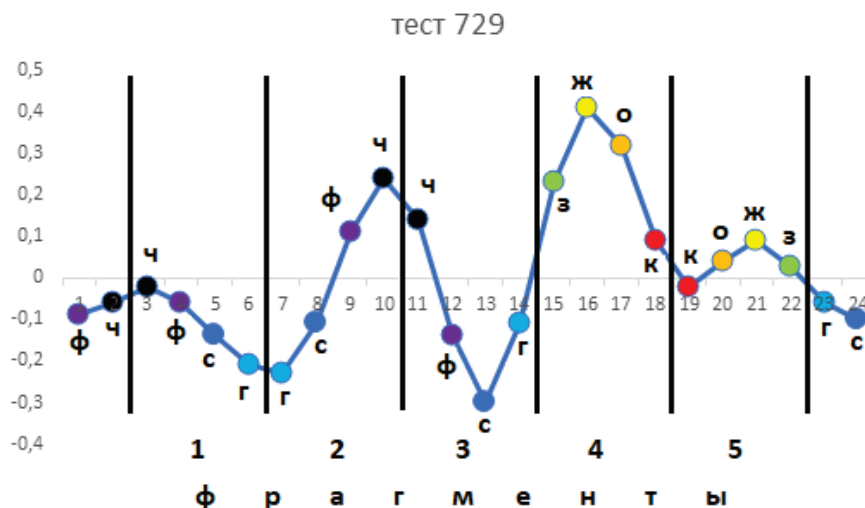


Рисунок 2. Результат разбиения на фрагменты списка сглаженных оценок настроения, усреднённых по двум методам NLP. Первый фрагмент начинается с третьей точки графика согласно результату Модуля 4. По вертикальной оси – уровень настроения (от -1 до +1), по горизонтальной – номер полуцикла включения внимания DAN. Буквы – это обозначение цветов секторов (см. рис. 3): Ф – фиолетовый, Ч – черный и т.д.

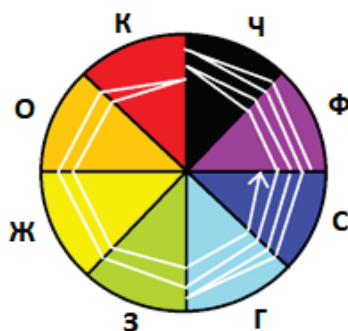


Рисунок 3. Круговая диаграмма изменения настроения в тесте №729, построенная на основе данных рисунка 2. По итогам теста №729 можно говорить об устойчиво подавленном исходном и финальном настроении тестируемого. Это заключение основано на данных рисунка 3, и на эмпирически обоснованной схеме (рис. 4), составленной по результатам множества тестов



Рисунок 4. Полученная по результатам множества тестов сводка особенностей настроения волонтеров к моменту начала тестирования. В случайной выборке оказалось 13 «гармоничных», 3 «приподнятых», 7 «подавленных» и 14 «озабоченных» тестов. Близость числа «гармоничных» и «озабоченных» тестов случайна, т.к. тест определенно различает «гармоничных» и «озабоченных»: на это указал опыт со студентами, тестировавшимися сразу после экзамена. У них распознана кажущаяся (спровоцированная экзаменом) «озабоченность», не исчезнувшая за время примерно получасового теста. Среди «приподнятых», «подавленных» и «озабоченных» могут быть случаи, соответственно, мании, депрессии и шизофрении; заболевание у такого волонтера может быть подтверждено в дополнительной серии тестов

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Компьютерный подход к интерпретации итогов ассоциативного цепного вербального теста обещает существенно упростить диагностику мышления и повысить достоверность её результатов. Сравнение экспертной оценки и компьютерного анализа демонстрирует высокую степень совпадения, что подтверждает объективность применяемых алгоритмов NLP. Данный подход позволяет существенно сократить время обработки данных и уменьшить субъективный фактор. Критерий правильности предложенного алгоритма автоматизации основывается на совпадениях с оценками экспертов. Окончательные формулировки метода пока не установлены, поэтому остаются возможности для его дальнейшего улучшения. Например, можно дополнить Модули 1 и 2 другими методами расчёта настроения. Также можно исследовать стабильность результатов при изменении числовых параметров эмпирических шаблонов в Модуле 4.

Автоматизация анализа ЦВТ открывает новые возможности для оперативного контроля ментального состояния, что имеет важное значение для экспериментальной диагностики аномалий в мышлении. Программа автоматизированной диагностики состояния мышления позволяет получить детализированное представление о функционировании когнитивных процессов и закладывает основу для разработки новых диагностических методик, уточняющих представление о мышлении. Авторы статьи [10] пришли к выводу, подтверждённому и в настоящем исследовании, что ни одна из двух систем, описанных в фундаментальной работе [1], не контролирует процессы внимания самостоятельно, а только их тесное взаимодействие обеспечивает необходимое динамическое управление вниманием. Также отмечено (см. [9]), что системы DAN и VAN являются супрамодалными, что подтверждают экспериментальные исследования [10] и [11]. Действительно, в ассоциативных цепных вербальных тестах наблюдается смешение кинестетических, визуальных, аудиальных и других типов ассоциаций.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты подтверждают эффективность и перспективность использования предложенной компьютерной программы для описания процесса мышления, что способствует совершенствованию теоретических представлений и практических приложений.

Работа выполнена по госзаданию ИТЭБ РАН, № регистрации 075-00223-25-03.

Список литературы / References:

1. Corbetta M., Shulman G.L. Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2002, vol. 3, no. 3, pp. 201-215, DOI: 10.1038/nrn755. PMID: 11994752.
2. Коломбет В. *Трансфизические миры*. В кн.: В. Коломбет. Трансфизические миры. Происхождение имён. М.: КРОН-ПРЕСС, 2001, 864 с. [Kolombet V. *Transfizicheskie miry*. V knige: V. Kolombet. *Transfizicheskie miry*. Proiskhozhdenie imeon. M.: KRON-PRESS, 2001, 864 p. (In Russ.)].
3. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Психоанализ как биофизический метод. *Известия Института инженерной физики*, 2023, № 4(70), с. 2-5 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V. *Psychoanalyz kak biofisicheskiy metod*. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2023, no. 4(70), pp. 2-5 (In Russ.)].
4. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Коломбет В.В. Представление структуры естественного интеллекта в биофизическом психоанализе. *Известия Института инженерной физики*, 2024, № 1(71), с. 13-17 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Kolombet V.V. *Predstavlenie struktury estestvennogo intellekta v biofisicheskom psykhoanalze*. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2024, no. 1(71), pp. 13-17 (In Russ.)].
5. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. «Навязанное мышление» как работа полурукотворного мозгового мультивибратора. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2024, т. 9, № 1, с. 61-65 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V. «Navyazannoe myshlenie» kak rabota polu-rukotvornogo mozgovogo multivibratora. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2024, vol. 9, no. 1, pp. 61-65 (In Russ.)].
6. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Перспектива исследования психоактивных веществ в биофизическом психоанализе. *Известия Института инженерной физики*, 2024, № 2(72), с. 49-56 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V. *Perspektiva issledovaniya psykhoaktivnykh veshchestv v biofisicheskom psykhoanalze*. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2024, no. 2(72), pp. 49-56 (In Russ.)].
7. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Перспектива физиологических исследований в биофизическом психоанализе. *Известия Института инженерной физики*, 2024, № 3(73), с. 88-98 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V. *Perspektiva fisiologicheskikh issledovaniy v biofisicheskom psykhoanalze*. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2024, no. 3(73), pp. 88-98 (In Russ.)].
8. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Возможен ли в мышлении квантовый компьютер? *Известия Института инженерной физики*, 2025, № 1(75), с. 90-97 [V.A. Kolombet, V.N. Lesnykh, A.V. Elistratov. *Perspektiva issledovaniya psykhoaktivnykh veshchestv v biofisicheskom psykhoanalze*. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2024, no. 2(72), pp. 49-56 (In Russ.)].
9. Vossel S., Geng J.J., Fink G.R. Dorsal and ventral attention systems: distinct neural circuits but collaborative roles. *Neuroscientist*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 150-159, DOI: 10.1177/1073858413494269.
10. Macaluso E. Orienting of spatial attention and the interplay between the senses. *Cortex*, 2010, vol. 46, no. 3, pp. 282-297.
11. Macaluso E., Driver J. Multisensory spatial interactions: a window onto functional integration in the human brain. *Trends Neurosci*, 2005, vol. 28, no. 5, pp. 264-271.

PROGRAM FOR PROCESSING THE RESULTS OF THOUGHT SCANNING USING A CHAIN VERBAL TEST

Lesnykh V.N., Yelistatov A.V., Kolombet V.A.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS

Institute str., 3, Pushchino, 3142290, Russia; e-mail: 1253vadim@mail.ru

Received 11.07.2025

Abstract. Human thinking represents significant scientific and practical interest. The concepts of "attention" and "mood," traditionally considered difficult to formalize, have proven to be key to describing the thinking process. According to 30 years of results from our research group, the basis of the thinking process is the interaction of two well-known attention systems: the dorsal attention network (DAN) and the ventral attention network (VAN). To track the closely interconnected functioning of this pair of systems and analyze their role in the thinking process, we applied an associative chain verbal test (CVT) that we developed, allowing for the study of the dynamics of cognitive processes. During the CVT, any random word is first chosen (and recorded), and associations are listed in the form of a series of words. This is the DAN stage. The last recorded word is immediately selected as a new "random word," and the moment of switching to the beginning of generating the next series of associations plays the role of the VAN stage. The result of the CVT is a text – a series of series of associations. It usually takes from 10 minutes to half an hour. The article presents a computer program for the automated interpretation of the test results, based on natural language processing (NLP) tools. The test demonstrates systematic discrete changes in mood accompanying the thinking process. The text of the test is broken down into groups of four series of associations and, accordingly, into groups of four numbers obtained through NLP. By comparing them with templates, the program reconstructs a cyclical picture – a mental trajectory moving along a standard "framework" of thinking, modulated by changing moods.

Key words: chain verbal test, DAN, dorsal attention network, VAN, ventral attention network, discrete mood series, attention, mood.

ИНГИБИТОР КОМПЛЕКСА ARP2/3, СОЕДИНЕНИЕ СК-0944666, ОСЛАБЛЯЕТ СТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Бельтов М.А.³

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

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Литовская ул., 2, г. Санкт-Петербург, 194100, РФ

³ Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет
ул. Профессора Попова, 14, лит. А, г. Санкт-Петербург. 197376, РФ

Поступила в редакцию 11.07.2025

Аннотация. Статья продолжает цикл работ, посвященных исследованию редокс-регуляции транспорта ионов в осморегулирующих эпителиях. Изучаются биофизические механизмы действия фармакологического аналога окисленного глутатиона (GSSG) - препарата глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) на трансэпителиальный транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Глутоксим продемонстрировал клиническую эффективность при лечении бактериальных и вирусных инфекций, псориаза, а также в качестве поддерживающей терапии при радио- и химиотерапии. В настоящее время сигнальные пути, участвующие в регуляторном действии GSSG и его фармакологических аналогов интенсивно изучаются. Активным компонентом глутоксима является GSSG. GSSG индуцирует S-глутатионилирование белков, которое признано важной посттрансляционной модификацией, влияющей на конформацию различных структурных белков, включая актин или другие кластеры белков, отвечающие за энергетический метаболизм/гликолиз, клеточную сигнализацию, гомеостаз кальция, фолдинг белков и окислительно-восстановительный гомеостаз. Известно, что в эпителиях актиновый цитоскелет участвует в модуляции Na^+ -транспортирующих белков, при этом динамическое изменение процессов роста и ветвления актиновых филаментов является одним из важнейших механизмов, опосредующих эту регуляцию. Белковый комплекс Arp2/3 является единственным известным нуклеатором роста и ветвления филаментов F-актина. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать роль Arp2/3 комплекса в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. С использованием метода фиксации потенциала исследовано влияние ингибитора комплекса Arp2/3 – соединения СК-0944666 – на эффект глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки *Rana temporaria*. Показано, что преинкубация кожи лягушки с соединением СК-0944666 (100 мкМ) существенно снижает стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ . Таким образом, полученные нами результаты и данные литературы позволяют рассматривать белковый комплекс Arp2/3 в качестве важного звена, вовлеченного в сигнальные каскады, запускаемые глутоксимом в эпителии кожи лягушки.

Ключевые слова: транспорт Na^+ , глутоксим, эпителий кожи лягушки, комплекс Arp2/3, СК-0944666.

Трансэпителиальный транспорт – основополагающий процесс поддержания гомеостаза, включающий множество путей и механизмов. Понимание этих механизмов имеет решающее значение для различных областей применения, включая теоретическую биологию и практическую медицину. Удобными модельными объектами для изучения транспорта ионов, питательных веществ и фармакологических соединений через эпителиальные ткани *ex vivo* в норме и патологии являются изолированные эпителии амфибий. Осморегулирующие эпителии кожи и мочевого пузыря амфибий – широко используемые и чрезвычайно удобные модели для изучения транспортных характеристик основных клеток собирательных трубочек нефрона млекопитающих. Известно, что они сходным образом реагируют на физиологически значимые концентрации всех гормонов (альдостерон, вазопрессин, инсулин и инсулиноподобный фактор роста 1), которые обычно контролируют активность ключевых Na^+ -транспортирующих белков в дистальном сегменте нефрона [1].

Транспорт ионов Na^+ в эпителии кожи лягушки осуществляется благодаря согласованной работе различных Na^+ -транспортирующих белков. Накоплено большое количество данных, свидетельствующих о том, что изменения окислительно-восстановительного потенциала модулируют активность ключевых Na^+ -транспортирующих белков, таких как амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC) в апикальном, и Na^+/K^+ -АТФазы в базолатеральном домене полярной эпителиальной клетки, и могут регулировать транспорт ионов в эпителиях различных типов [2,3]. Редокс-регуляция выступает в качестве важнейшего посредника в динамических взаимодействиях между организмом и внешней средой, оказывая глубокое влияние как на возникновение, так и на прогрессирование различных заболеваний. В физиологических условиях окислительные свободные радикалы могут быть эффективно нейтрализованы антиоксидантными реакциями. Нарушение этого тонко настроенного равновесия тесно связано с патогенезом широкого спектра заболеваний.

Эти результаты закладывают основу для изучения окислительно-восстановительной регуляции как механистической основы для совершенствования терапевтических стратегий.

Ранее мы обнаружили, что транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки *Rana temporaria* регулируется различными окисляющими агентами [4]. Было показано модулирующее действие низкомолекулярных дисульфидсодержащих соединений, таких как цистин, цистамин, окисленный глутатион (GSSG) и его синтетический аналог препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург), на транспорт Na^+ в коже лягушки. Фармакологические препараты на основе GSSG – тиопозтины – обладают доказанным системным цитопротекторным эффектом, в связи с чем, нашли широкое медицинское применение в качестве иммуномодуляторов и цитопротекторов. В настоящее время тиопозтины используются в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [5,6]. Фармакологические аналоги GSSG оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках. Активным компонентом таких препаратов является GSSG, который оказывает множественное воздействие на окислительно-восстановительные пути как на поверхности клетки, так и внутри неё. GSSG индуцирует S-глутатионилирование некоторых белков и влияет на сигнальные пути, регулируемые ключевыми сигнальными белками. Глутатионилирование SH-групп остатков цистеина белков – обратимая посттрансляционная модификация, которая представляет собой обратимое образование смешанных дисульфидов между GSSG и остатками цистеина в белках. S-Глутатионилирование модулирует функцию белков, ингибирует или усиливает ферментативную активность, поддерживает окислительно-восстановительный гомеостаз и защищает некоторые белки от необратимого окислительного стресса, в связи с чем данный тип посттрансляционных модификаций тиоловых групп играет важную роль в регуляции ряда клеточных процессов и защите от окислительного повреждения. Аномальные паттерны S-глутатионилирования ассоциированы с различными заболеваниями, особенно связанными с окислительным стрессом и воспалением, такими как сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные расстройства, рак и многие другие. В настоящее время сигнальные пути, участвующие в регуляторном действии GSSG и его фармакологических аналогов интенсивно изучаются. Особую практическую значимость имеют исследования роли этих препаратов в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки.

Известно, что для реализации своих уникальных транспортных свойств эпителиальные клетки приобретают характерные структурные и функциональные особенности. Эпителиальный слой представляет собой четко выраженный макроскопический барьер проницаемости, что приводит к избирательному транспорту растворенных веществ и воды через всю ткань. Для этого транспортные эпителии должны развивать сложный набор клеточных соединений и поляризованное распределение мембранных молекул, которые локализуются в противоположно ориентированных апикальных и базолатеральных доменах плазматической мембраны эпителиальной клетки. Формирование и поддержание такого поляризованного эпителиального фенотипа требует характерной организации компонентов цитоскелета. Помимо связей с клеточными соединениями, цитоскелет также взаимодействует, напрямую или косвенно, с различными транспортными системами в плазматической мембране. При этом связывание с цитоскелетом модулирует различные виды транспорта ионов через эпителий. Эта взаимосвязь между элементами цитоскелета и системами транспорта ионов играет важную роль в физиологии транспортных эпителиев. Актиновый цитоскелет представляет собой динамическую структуру, необходимую для организации и нормального функционирования всех клеток и тканей. Актиновый цитоскелет состоит из актиновых филаментов и ассоциированных с ними актин-связывающих белков и играет важную роль в различных клеточных процессах, включая поддержание формы клетки, начало клеточной подвижности, эндо- и экзоцитоз, мембранный транспорт, а также распределение и стабильность интегральных мембранных белков. Однако функциональные взаимодействия между актиновым цитоскелетом и специфическими мембранными транспортными белками изучены недостаточно, особенно в нативных эпителиях.

Известно, что в эпителиальных клетках актиновый цитоскелет участвует в модуляции активности многих Na^+ -транспортирующих белков, колокализированных с актиновыми филаментами и актин-связывающими белками, а также участвует в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ некоторыми гормонами [7]. Ключевую роль в процессах формирования микрофиламентов из мономеров G-актина играет белковый комплекс Arp2/3 (Actin-Related Proteins 2/3). Комплекс Arp2/3 является важным эволюционно консервативным нуклеатором актиновых филаментов. Комплекс регулирует архитектуру и динамику актинового цитоскелета, инициируя образование как разветвленных, так и линейных актиновых филаментов [8]. Данные литературы свидетельствуют о том, что динамические изменения в организации актинового цитоскелета могут представлять собой новый сигнальный механизм в регуляции ионного транспорта в эпителии. В основе этого взаимодействия лежит регуляция длины актиновых филаментов актин-связывающими белками и смежными структурами, что, в свою очередь, модулирует активность ионных каналов. В связи с этим, целью исследования являлось определение возможного участия процессов роста и ветвления актиновых филаментов в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали эффективный ингибитор комплекса Arp2/3 – СК-0944666. Соединение СК-0944666 широко используется для исследования процессов нуклеации актиновых филаментов, опосредованной комплексом Arp2/3 [8].

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 mM): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23°C).

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

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточный раствор амилорида (10 mM) готовили на воде. Маточный раствор соединения СК-0944666 (50 mM) 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. Соединение СК-0944666 добавляли за 30–40 мин до введения в раствор глутоксима.

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: $I_{SC} = 25,36 \pm 4,09$ мкА; $V_{OC} = -69,12 \pm 10,41$ мВ; $g_T = 0,37 \pm 0,02$ мСм.

Показано, что глутоксим (200 мкг/мл), приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулирует транспорт Na^+ ; данные приведены в таблице 1 и на рисунке 1.

Показано также, что предварительная обработка кожи лягушки СК-0944666 в концентрации 100 мкМ ослабляет стимулирующее действие глутоксима на трансэпителиальный транспорт Na^+ в коже лягушки (результаты приведены на рис. 1 и в табл. 1).

Таблица 1. Влияние глутоксима на электрические характеристики кожи лягушки

Электрические характеристики кожи лягушки	Изменение электрических характеристик после приложения глутоксима (200 мкг/мл) к базолатеральной поверхности нативной кожи лягушки, %	Изменение электрических характеристик после приложения глутоксима (200 мкг/мл) к базолатеральной поверхности кожи лягушки, предварительно обработанной со стороны апикальной поверхности ингибитором комплекса Arp2/3 – СК-0944666 (100 мкМ), %
I_{SC}	$\uparrow 37,29 \pm 11,14$	$\uparrow 21,32 \pm 4,23$
V_{OC}	$\uparrow 40,37 \pm 14,01$	$\uparrow 10,21 \pm 3,12$
g_T	$\uparrow 2,12 \pm 0,14$	$\uparrow 7,22 \pm 1,03$

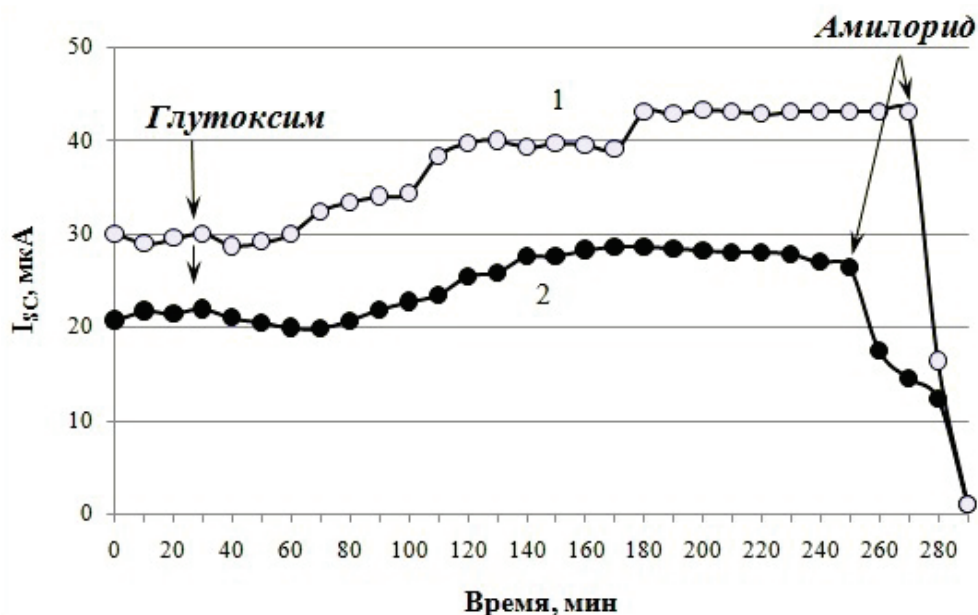


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки при приложении глутоксима (200 мкг/мл) к базолатеральной поверхности нативной кожи (1) и кожи лягушки, предварительно обработанной со стороны апикальной поверхности ингибитором комплекса Arp2/3 – СК-0944666 (100 мкМ) (2)

В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

Полученные нами результаты о регуляторном влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки согласуются с данными литературы. Согласно данным литературы, в эпителиях различных типов, изменение соотношения GSH/GSSG, катализирующее процессы деглутатионилирования/S-глутатионилирования белков, участвует в различных физиологических и патологических процессах, в том числе в регуляции окислительного стресса, воспалении и апоптозе. Обнаружена роль S-глутатионилирования в патогенезе различных заболеваний почек, включая диабетическую нефропатию, фиброз почек и острое повреждение почек. Путем S-глутатионилирования осуществляется регуляция активности ключевых эпителиальных ионных каналов и транспортеров, таких как ENaC [9,10], Na^+/K^+ АТФаза [11] или белок CFTR [12]. Так, на альвеолярных клетках I и II типа крысы и мыши было показано, что микромолярные концентрации GSSG значительно снижают скорость клиренса альвеолярной жидкости в экспериментах *in vivo* и ослабляют активность ENaC [9,10]. При этом с использованием конструкции кРНК человеческого ENaC и системы экспрессии ооцитов *Xenopus laevis*, было показано, что GSSG (400 мкМ) по-разному влияет на ток $\alpha\beta\gamma$ -ENaC и $\delta\beta\gamma$ -ENaC. GSSG увеличивал активность как $\delta\beta\gamma$ -, так и $\delta\beta\gamma$ -ENaC, но ингибировал $\alpha\beta\gamma$ -каналы [10]. Различия в реакциях альтернативных вариантов сборки каналов на GSSG указывают на то, что окислительно-восстановительная чувствительность эпителия дыхательных путей может зависеть от того, собираются ли в мембране δ - или α -субъединицы. В настоящее время, сигнальные механизмы, ответственные за контроль дифференциального ответа $\delta\beta\gamma$ - и $\alpha\beta\gamma$ -ENaC на GSSG, остаются неизвестными. Ранее нами также было показано, что GSSG и его фармакологические аналоги подавляют транспорт Na^+ и активность ENaC при приложении указанных агентов со стороны апикальной поверхности кожи лягушки [4].

Наиболее вероятно предположить, что стимулирующее влияние базолатеральной аппликации глутоксима, показанное нами, связано со способностью GSSG и его фармакологических аналогов оказывать рецептор-опосредованное влияние на клеточные процессы. Обнаружена способность GSSG и глутоксима к трансактивации (лиганд-независимой активации) рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и активации фактора транскрипции STAT3 в клетках эпидермоидной карциномы [13,14], а также рецептора 2 сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR2) в эндотелиальных клетках аорты человека [15]. Известно сходство аминокислотных последовательностей рецептора EGFR и рецептора инсулина, особенно в области тирозинкиназного домена и организации экстраклеточных доменов. Предполагается, что в случае эпителия кожи лягушки, GSSG и его фармакологические аналоги могут взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами α -субъединиц инсулинового рецептора, вызывать трансактивацию рецептора и запустить сигнальный каскад, приводящий к активации Na^+ -транспортирующих белков и стимуляции транспорта Na^+ [4,13,14]. В настоящее время отсутствует понимание конкретных механизмов, опосредующих активацию VEGFR2 рецептора GSSG. Наиболее вероятно, что увеличение концентрации GSSG может запустить S-глутатионилирование VEGFR2, однако эта модификация носит временный характер, и конкретные точки глутатионилирования не определены. Другой потенциальный механизм активации связан с сигнальным путем протеинтирозинкиназ семейства Src [15].

Результаты настоящего исследования свидетельствуют также о том, что ингибитор комплекса Arp2/3 – соединение СК-0944666 ослабляет стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Полученные данные позволяют предположить, что динамические изменения в организации актинового цитоскелета и регуляция организации актиновых филаментов актин-связывающими белками Arp2/3 существенно важны для реализации регуляторного влияния глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты согласуются с данными литературы. В течение многих лет интенсивно исследуются функциональные взаимодействия между актиновым цитоскелетом и специфическими мембранными транспортными белками, а также регуляторная роль организации актиновых филаментов в активности эпителиальных Na^+ -транспортирующих белков. Ранее нами было показано, что вискостатин, ингибитор белка N-WASP (Wiskott-Aldrich syndrome family proteins, семейство белков синдрома Вискотта-Олдрича), входящего в состав сайтов нуклеации и активации комплекса Arp2/3, существенно снижает трансэпителиальный транспорт Na^+ и активность ENaC в эпителии кожи лягушки [16]. Таким образом, результаты наших предыдущих экспериментов и настоящего исследования существенно дополняют данные литературы о роли процессов роста и ветвления актиновых филаментов в регуляции трансэпителиального транспорта ионов Na^+ в осморегулирующих эпителиях. Известно, что ENaC, экспрессирующиеся в апикальных мембранах поляризованного эпителия, играют центральную роль в абсорбции Na^+ и поддержании водно-солевого гомеостаза. Многочисленные экспериментальные результаты, накопленные с 1990-х годов, свидетельствуют о том, что ENaC напрямую или через актин-связывающие белки взаимодействуют с актиновым цитоскелетом. Прямое связывание F-актина с C-концом α -ENaC показано в клетках почки собаки (MDCK), что свидетельствует об участии актиновой сети в функционировании ENaC [17]. В дальнейшем было показано, что F-актин и ENaC колокализуются как на апикальной мембране, так и в субапикальной цитоплазме. Колокализация α -ENaC и F-актина в субапикальной цитоплазме предполагает, что в дополнение к регуляции активности ENaC прямое взаимодействие между F-актином и ENaC может регулировать внутриклеточный транспорт ENaC из субапикального пула в плазматическую мембрану в ответ на стимуляцию гормонами, такими как вазопрессин и инсулин [7,17]. Данные литературы свидетельствуют о том, что ключевую роль в модуляции активности ENaC

играют короткие актиновые филаменты, а не мономерный G- или фибриллярный F- актин. Кроме того, наблюдается существенное различие во влиянии архитектуры актинового цитоскелета на активность ENaC в зависимости от типа экспериментального объекта. В настоящее время модулирующая роль актиновых филаментов в функционировании ENaC была описана на примере клеток A6 (клетки почки южноафриканской шпорцевой жабы, *Xenopus laevis*), клеток MDCK, ооцитов *Xenopus* и плоских липидных бислоев, тогда как роль цитоскелета в регуляции ENaC в нативных тканях неясна.

На эпителиальных клетках различных типов было обнаружено, что в модуляцию активности ENaC вовлечены также различные актин - ассоциированные белки. Так, на трансфицированных клетках яичников китайского хомячка (линия CHO) показано, что комплекс Arp2/3 и актин-связывающий белок кортактин модулируют воротные характеристики ENaC, снижая вероятность открытого состояния канала [18]. В дальнейшем было показано, что в состав мультибелкового комплекса, отвечающего за актин-зависимую регуляцию активности ENaC, входит также адаптерный белок MIM (missing-in-metastasis, отсутствующий при метастазах белок MIM, также известный как MTSS1) [19]. MIM регулирует динамику цитоскелета и полимеризацию актина, а также участвует в контроле подвижности и инвазии клеток. Также было показано, что MIM связывается с рецепторной тирозинфосфатазой РТР (PTPδ). Это взаимодействие обеспечивает связь между сигнализацией, зависящей от фосфорилирования тирозина, и метастазированием [20]. Известно также, что ENaC колокализованы с такими актин-связывающими белками, как анкирин и спектрин. Доказано непосредственное взаимодействие между ENaC и SH₃-доменом α-спектрина благодаря наличию богатого пролином участка на C-терминальном конце α-субъединицы ENaC [21]. Ремоделирование цитоскелета обеспечивает силы, необходимые для множества клеточных процессов, основанных на динамике мембраны, таких как эндоцитоз, экзоцитоз и везикулярный транспорт в аппарате Гольджи. Все эти события координируются сетями ассоциированных белков.

Ранее нами также было показано, что транспорт Na⁺ в коже лягушки зависит от структурно-функциональной организации актинового и тубулинового цитоскелета. Обнаружено также, что любые изменения в структуре микротрубочек и микрофиламентов приводят к снижению стимулирующего действия глутоксима на транспорт Na⁺ [22,23]. Даже в состоянии покоя цитоскелет эпителиальных клеток отличается высокой динамичностью, подвергаясь постоянной сборке и разборке своих структурных единиц. По этой причине он подчиняется сложным механизмам регуляции, многие из которых включают компоненты межклеточных соединений и другие мембранные белки. Результаты настоящей работы также свидетельствуют о том, что ингибирование процессов роста и ветвления актиновых филаментов приводит к снижению транспорта Na⁺ и существенному ослаблению стимулирующего эффекта глутоксима на транспорт Na⁺ в коже лягушки.

Таким образом, полученные нами результаты и данные литературы позволяют рассматривать белковый комплекс Arp2/3 в качестве важного звена, вовлеченного в сигнальные каскады, запускаемые глутоксимом в эпителии кожи лягушки. Полученные нами результаты о роли соединения СК-0944666 в регуляции глутоксимом трансэпителиального транспорта Na⁺ способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных GSSG, а также дополняют данные о функциональной роли тиопозтинов в физиологии осморегулирующих эпителиев, и могут быть полезны для применения данных препаратов в клинической практике. Недавно было обнаружена ключевая роль комплексов Arp2/3 во многих клеточных процессах, которые нарушаются при патологических состояниях. В том числе обнаружено, что ингибитор связывания ArpC2 подавляет миграцию раковых клеток и метастазирование опухолей, что позволяет рассматривать белковый комплекс Arp2/3 и его ингибиторов в качестве новых молекулярных механизмов и перспективных мишеней, ответственных за противоопухолевую и антиметастатическую активность [24].

В то же время, сигнальные каскады, вовлеченные в регуляцию глутоксимом транспорта Na⁺ 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. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.
3. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.
4. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide-containing agents on the Na⁺ transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2008, vol. 421, pp. 235-238, doi: 10.1134/s0012496608040042.
5. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. II. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции. *Биомед. Химия*, 2009, т. 55, no. 4, с. 365-379 [Kulinskiy 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.)].

6. 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 thiopoetin group medicines for cirrhosis of the liver. First communication. *Vestnic hirurgii im. I.I. Grekova*, 2001, vol. 4, no. 2, pp. 32-38.
7. Tsakiridis T., Vranicel M., Klip A. Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, no. 47, pp. 29934-29942.
8. Nolen B.J., Tomasevic N., Russel A., Pierce D.W., Jia Z., Mc Cormick C.D., Hartman J., Sakowicz R., Pollard T.D. Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature*, 2009, vol. 460, pp. 1031-1034.
9. Downs C.A., Kreiner L., Zhao X.-M., Trac P., Johnson N.M., Hansen J.M., Brown L.A., Helms M.N. Oxidized glutathione (GSSG) inhibits epithelial sodium channel activity in primary alveolar epithelial cells. *Amer. J. Physiol. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2015, vol. 308, no. 9, pp. L943-L952, DOI: 10.1152/ajplung.00213.2014.
10. Grant G., Coca C., Xingming Z., Helms M.N. Oxidized glutathione increases delta-subunit expressing epithelial sodium channel activity in *Xenopus laevis* oocytes. *Emed. Res.*, 2020, vol. 2, Article ID: 100008.
11. Tamma G., Valenti G. Evaluating the oxidative stress in renal diseases: What is the role for S-Glutathionylation? *Antioxid. Redox Signal.*, 2016, vol. 25, no. 3, pp. 147-164, doi: 10.1089/ars.2016.6656.
12. Wang W., Oliva C., Li G., Holmgren A., Lillig C.H., Kirk K.L. Reversible silencing of CFTR chloride channels by glutathionylation. *J. Gen. Physiol.*, 2005, vol. 125, no. 2, pp. 127-141, DOI: 10.1085/jgp.200409115.
13. 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.
14. 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.
15. Prasai P.K., Bandana Sh., Wayne O.A., Pattillo C.B. Decreases in GSH:GSSG activate vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in human aortic endothelial cells. *Redox Biology*, 2018, vol. 19, pp. 22-27, DOI: 10.1016/j.redox.2018.07.015.
16. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И. Ингибитор WASP белков вискостатинов подавляет транспорт Na^+ в коже лягушки. *Биология -наука XXI века: 19-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых*. Пушчино: Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, 2015, с. 101-102 [Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I. WASP protein inhibitor viscostatin suppresses Na^+ transport in frog skin. *Biology is a science of the 21st century: 19th International Pushchino School-Conference of Young Scientists*. Pushchino: Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, 2015, pp. 101-102 (In Russ.)].
17. Mazzochi C., Bubien J.K., Smith P.R., Benos D.J. The carboxyl terminus of the alpha-subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel binds to F-actin. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, pp. 6528-6538, DOI: 10.1074/jbc.M509386200.
18. Karpushev A.V., Levchenko V., Ilatovskaya D.V., Pavlov T.S., Staruschenko A. Novel role of Rac1/WAVE signaling mechanism in regulation of the epithelial Na^+ channel. *Hypertension*, 2011, vol. 57, pp. 996-1002, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.157784.
19. Shuyskiy L.S., Levchenko V.V., Negulyaev Y.A., Staruschenko A.V., Ilatovskaya D.V. Role of the scaffold protein MIM in the actin-dependent regulation of epithelial sodium channels (ENaC). *Acta Naturae*, 2018, vol. 10, no. 2, pp. 97-103, DOI: 10.32607/20758251-2018-10-2-97-103.
20. Woodings J.A., Sharp S.J., Machesky L.M. MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. *Biochem. J.*, 2003, vol. 371, Pt. 2, pp. 463-471, DOI: 10.1042/BJ20021962.
21. Rotin D.D., Bar-Sagi D., O'Brodovich H., Merilainen J., Lehto V.P., Canessa C.M., Rossier B.C., Downey G.P. An SH₃ binding region in the epithelial Na^+ channel (arENaC) mediated localization at the apical membrane. *EMBO J.*, 1994, vol. 13, pp. 4440-4450.
22. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin: the role of cytoskeleton. *Cell and Tissue Biology*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 248-253, DOI: 10.1134/S1990519X1203008X.
23. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The involvement of microtubules in the glutoxim regulation of Na^+ transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2012, vol. 445, pp. 227-229, DOI: 10.1134/S0012496612040205.
24. Choi J., Lee Y.J., Yoon Y.J., Kim C.H., Park S.J., Kim S.Y., Doo Kim N., Cho Han D., Kwon B.M. Pimozide suppresses cancer cell migration and tumor metastasis through binding to ARPC2, a subunit of the Arp2/3 complex. *Cancer Sci.*, 2019, vol. 110, pp. 3788-3801, DOI: 10.1111/cas.14205.

ACTIN-RELATED PROTEIN-2/3 (ARP2/3) COMPLEX INHIBITOR, COMPOUND CK-0944666,
ATTENUATES THE STIMULATING EFFECT OF GLUTOXIM ON Na⁺ TRANSPORT IN FROG SKIN
EPITHELIUM

Melnitskaya A.V.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Beltov M.A.³

¹ St. Petersburg State University

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

² St. Petersburg State Pediatric Medical University

Litovskaya str., 2, St. Petersburg, 194100, Russia

³ St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University

Professor Popov str., 14, lit. A, St. Petersburg, 197376, Russia

Received 11.07.2025

Abstract. The article continues a series of works devoted to the study of redox regulation of ion transport in osmoregulatory epithelia. The biophysical mechanisms of action of the pharmacological analogue of oxidized glutathione (GSSG) - the drug Glutoxim® (disodium salt of GSSG with d-metal in nanoconcentration, "PHARMA-VAM", St. Petersburg) on transepithelial transport of Na⁺ in the epithelium of frog skin are studied. Glutoxim has demonstrated clinical efficacy in the treatment of bacterial and viral infections, psoriasis, and as a supportive therapy in radio- and chemotherapy. Currently, the signaling pathways involved in the regulatory action of GSSG and its pharmacological analogues are being intensively studied. The active component of Glutoxim is GSSG. GSSG induces S-glutathionylation of proteins, which is recognized as an important post-translational modification affecting the conformation of various structural proteins, including actin or other protein clusters responsible for energy metabolism/glycolysis, cell signaling, calcium homeostasis, protein folding, and redox homeostasis. It is known that in epithelia the actin cytoskeleton is involved in the modulation of Na⁺-transporting proteins, and the dynamic change in the processes of growth and branching of actin filaments is one of the most important mechanisms mediating this regulation. The actin-related protein 2/3 (Arp2/3) complex is the only known nucleator of branched F-actin filaments. Therefore, it seemed appropriate to investigate the role of the Arp2/3 complex in Glutoxim regulation of Na⁺ transport in frog skin epithelium. The effect of the Arp2/3 complex inhibitor, compound CK-0944666, on Glutoxim effect on Na⁺ transport in the frog *Rana temporaria* skin epithelium was studied using voltage-clamp method. It was shown that preincubation of frog skin with the compound CK-0944666 (100 μM) significantly reduces the stimulatory effect of Glutoxim on Na⁺ transport. Thus, our results and literature data allow us to consider the Arp2/3 protein complex as an important link involved in the signaling cascades triggered by Glutoxim in the frog skin epithelium.

Key words: Na⁺ transport, Glutoxim, frog skin epithelium, Arp2/3 complex, CK-0944666.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ФОТОХРОМНОГО ХЕЛАТОФОРА

Беликов Н.Е.¹, Демина О.В.¹, Лукин А.Ю.², Варфоломеев С.Д.¹, Ходонов А.А.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: khodonov@gmail.com

² МИРЭА – Российский технологический университет
пр. Вернадского, 78, г. Москва, 119454, РФ

Поступила в редакцию 13.07.2025

Аннотация. В настоящей работе представлены результаты проведенных авторами исследований, направленных на разработку способов получения новых фотохромных хелатофоров, способных к фотоуправляемому взаимодействию с неорганическими компонентами. В работе особое внимание было уделено выбору нужного строения молекулы фотохрома и реализации на практике лабораторной технологии синтеза целевого соединения с заданными оптическими параметрами. Для обеспечения селективного связывания хелатофора с катионами или другими типами заряженных лигандов в C5'-положение молекулы, через метиленовый мостик был введен «молекулярный адрес» - фрагмент диэтилового эфира иминодиацетата, обладающий способностью взаимодействовать с различными катионами металлов. Также в работе были приведены результаты изучения фотохромного поведения хелатофора и селективности процессов его комплексообразования с различными солями металлов. Исследование его спектральных характеристик показало наличие у него ярко выраженного фотохромизма. Он также образовывал фотоуправляемые комплексы с катионами металлов с определенной селективностью. Наблюдалась выраженная селективность ионофорного фрагмента молекулы хелатофора к образованию комплексов с солями трехвалентных катионов. Полученные результаты открывают перспективы для использования новых фотохромов, на основе функционализированных спиропиранов, в качестве новых гибридных материалов для создания на их основе: сенсоров и детекторов металлов, компонентов фотохромных систем и прототипов smart-устройств молекулярной электроники.

Ключевые слова: фотохромные хелатофоры и ионофоры, спиропираны, катионы металлов, комплексообразование.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы широкое развитие получили исследования в области создания фотоуправляемых гибридных фотохромных систем на основе спиропиранов и всестороннего изучения их свойств и перспектив практического применения [1-4]. Фотоуправляемые фотохромные хелатофоры, ионофоры и искусственные рецепторы, позволяющие контролировать процесс комплексообразования с разнообразными по природе катионами металлов и спектральные характеристики и физические свойства образующихся в результате продуктов с помощью освещения образца светом с определенной длиной волны, привлекают особый интерес исследователей в различных областях. Особые перспективы подобные системы имеют при разработке целого ряда прототипов технических smart-устройств в бионанопотонике и сенсорных технологиях [5-15].

Выбор спиробензопирана в качестве целевого фотохромного звена был сделан при учете следующих обстоятельств: а) индолиновые спиробензопираны являются одними из наиболее изученных классов фотохромных соединений; б) спектральные свойства и параметры их фотопревращений сильно зависят от природы имеющихся в молекуле заместителей, поэтому направленное варьирование их природы позволяет целенаправленно проводить поиск новых фотохромов с заданными фотохимическими характеристиками и разнообразными стимул-реагирующими элементами структуры и «молекулярными адресами».

Кроме того, фотохромные системы на основе спиробензопиранов предпочтительны из-за того, что фотоиндуцированная мероцианиновая (МС) форма спиробензопирана обладает бинарной комбинацией двух различных аналитических сигналов: (1) изменение значения параметра оптической плотности поглощения в диапазоне 450-630 нм и (2) фотоиндуцируемая полоса флуоресценции при 650 нм.

Цель настоящей работы состояла: 1) в дизайне целевой структуры молекулы хелатофора (SP 1), 2) в разработке способа его получения, 3) в изучении его фотохромного поведения и процессов комплексообразования с катионами металлов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез фотохромного хелатофора (SP 1). Структура возможных целевых субстратов-мишеней определяет природу реакционноспособной якорной группы фотохрома. При создании молекул фотохромов с заданными спектральными и фотохимическими параметрами на основе фотохромов ряда спиропирана необходимо наличие электроноакцепторного заместителя по 6-положению, чаще всего – нитро-группы, при сохранении места введения молекулярного адреса по 5'-положению молекулы.

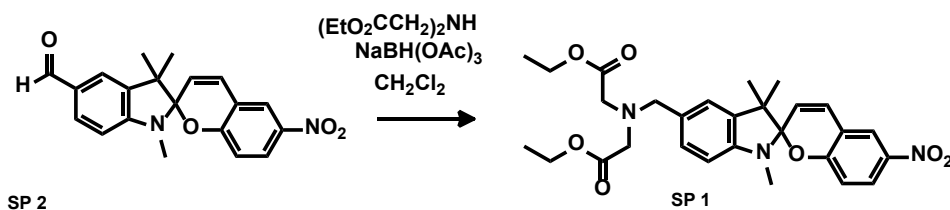
В последние годы, с использованием современных синтетических методов, были широко развернуты исследования по поиску эффективных вариантов введения заместителей различной природы по индолининовому фрагменту молекулы спиропирана с целью получения новых структур фотохромов, содержащих молекулярные адреса различной природы и назначения [5-15]. Оптическими свойствами таких гибридных систем можно обратимо управлять, воздействуя на них светом с контролируемой длиной волны и / или дополнительными стимулами. Основные варианты введения заместителей различной природы в пирановые и / или индолининовые фрагменты молекулы спиропирана заключаются в: 1) полном синтезе производных фотохрома путем конденсации замещенной четвертичной соли или соответствующего свободного метиленового основания (индоленина) с замещенными 2-гидроксibenзальдегидами, при нагревания смеси этих реагентов в спиртовом растворе; 2) прямая модификация молекулы подходящего предшественника спиропирана [5-15]. Последний подход обычно осуществляется за счет образования ковалентной связи между гидроксильными, amino- или карбоксильными группами спиропирановых предшественников с дополнительными функциональными группами в молекуле-мишени [2]. Были известны несколько примеров подобных фотохромных систем, которые содержали различные типы реакционноспособных якорных групп со сродством к катионам. В большинстве ранних работ место введения ионофорного фрагмента было локализовано по N1'-атому индолининового фрагмента молекулы. Среди них были описаны разнообразные производные тиолов, краун-эфиров, подантов, хелатофоров, иминодиацетатов, N-гетероциклов, бипиридинов и дендримеров [2,5-9,11-15].

Для обеспечения возможности селективного связывания с катионами или другими типами заряженных лигандов мы ввели «молекулярный адрес» - фрагмент диэтилового эфира иминодиацетата, обладающий способностью связываться с катионами металлов, в положение C5' молекулы хелатофора (SP 1), через метиленовый мостик.

В химии производных спиропиранов нами ранее был разработан оригинальный путь направленного введения заместителей разнообразного строения при помощи селективного формилирования по Даффу с последующей модификации формильной функции в 5'-положении молекулы.

Исходное соединение – 6-нитроспиропиран – было селективно формилировано по C5'-положению индолининового фрагмента в условиях реакции Даффа при помощи запатентованного нами ранее метода [2,16], давая ключевой промежуточный продукт - 6-нитро-5'-формилспиропиран (SP 2) с выходом 86%. Этот предложенный нами оригинальный вариант одностадийной прямой модификации молекулы фотохрома выгодно отличался от уже известных ранее реакций электрофильного замещения в ряду производных спиропиранов, проходящих по 5'-му положению индолининового фрагмента [2]. Нами была продемонстрирована возможность успешного дополнительного расширения синтетического потенциала исходного предшественника – 6-нитро-5'-формилспиропирана (SP 2) с помощью направленной модификации по 5'-положению молекулы фотохрома с применением хорошо известных и простых экспериментальных процедур органического синтеза.

Так, для получения целевого фотохромного ионофора (SP 1) нами впервые была использована направленная модификация формильной группы в 5'-положении молекулы исходного фотохрома (SP 2) с применением эффективной экспериментальной процедуры органического синтеза - восстановительного аминирования в присутствии триацетоксигидрида натрия и избытка amino-компонента в среде дихлорметана [2].



Выход целевого фотохромного лиганда (SP 1) составил 43%. Целевое соединение (SP 1) было наработано в препаративных количествах и его строение было подтверждено данными ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. ЯМР-спектры растворов в дейтерохлороформе регистрировали на спектрометре Bruker Avance III-500 (Германия): ^1H -ЯМР-спектры с рабочей частотой 500 МГц, ^{13}C -ЯМР-спектры с рабочей частотой 126 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно внутреннего стандарта: дейтерохлороформа (δ (^1H -ЯМР) – 7,25 м.д. и (^{13}C -ЯМР) – 77,2 м.д.). Ниже приведено отнесение сигналов в ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР-спектрах фотохромного хелатофора (SP 1) в CDCl_3 (рис. 1).

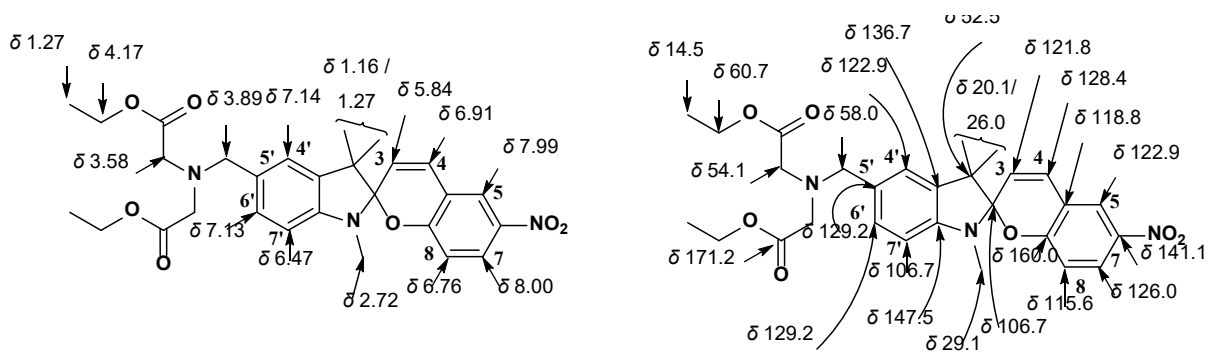
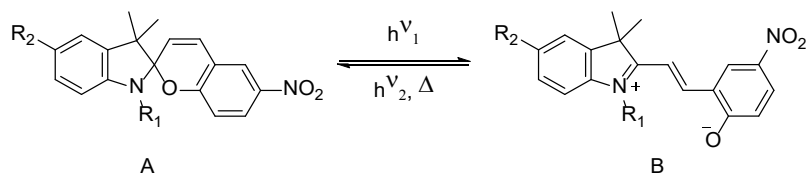


Рисунок 1. Химические сдвиги сигналов в ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР-спектрах фотохромного хелатофора (SP 1) в CDCl_3

Исследование фотохромного поведения и спектральных характеристик полученного фотохромного лиганда (SP 1). Хорошо известно, что в молекулах спиропиранов при освещении светом с длиной волны $\leq 300\text{--}350$ нм происходит раскрытие пиранового цикла с образованием окрашенной мероцианиновой формы (MC) (B). Данный процесс обратим: обратный переход в спироформу (A) происходит или путем самопроизвольной циклизации в темноте, или при освещении препарата MC видимым светом.



Измерения спектральных и фотохимических характеристик образцов растворов соединения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2140PC (Япония) с приставкой для термостатирования образцов и на специальном стенде, созданном на основе комплекта модульного оптоволоконного спектрофотометрического оборудования фирмы Ocean Optics (США): спектрофотометр модели HR-2000+ / спектрофлуориметр модели USB4000-FL, в кварцевых кюветах толщиной 10 мм с использованием растворителей марки "осч" с перемешиванием образца при 25°C . Фотоиндуцированные формы получали облучением образца светом ксеноновой лампы Hamamatsu (модель Lightningcure LC8, Hamamatsu, Япония) через светофильтр УФС-2 – (280–370 нм).

Спектры поглощения лиганда (SP 1) были сняты в ряду органических растворителей с разной полярностью: в этаноле, в ацетонитриле и в толуоле. Проведенное исследование спектральных характеристик нового хелатофора (SP 1) показало наличие у него ярко выраженного фотохромизма: в процессе УФ-облучения образца (SP 1) в разных органических растворителях светом ксеноновой лампы через светофильтр УФС-2 – (280–370 нм) появляется новые полосы поглощения при (538, 561, 605 нм), обусловленные образованием его MC формы. При дальнейшем облучении образца видимым светом данная полоса быстро исчезает. Все соединения характеризуются высокими значениями эффективности фотоокрашивания $\Delta D_{\text{в.фот}}$ в диапазоне 0,66–3,53. Определенные по стандартным методикам спектрально-абсорбционные и спектрально-флуоресцентные характеристики спиро- (A) и MC форм (B) хелатофора (SP 1) представлены ниже (см. рис. 2–7; табл. 1).

Проведено детальное изучение кинетики, спектральных превращений и процессов фотодеградации нового хелатофора (SP 1) в разных средах. Как следует из полученных данных (рис. 2А, 2Б, 3А; табл. 1), в процессе УФ-облучения раствора (SP 1) в этаноле появляется новая полоса поглощения при 538 нм, обусловленная образованием MC формы. Полосы фотоиндуцированной MC формы фотохромного лиганда (SP 1) (538 нм этанол, 561 нм ацетонитрил, 605 нм толуол) самопроизвольно медленно исчезают при выдерживании образца в темноте или быстро при облучении видимым светом, причем в толуоле процесс обесцвечивания фотоиндуцированной MC формы происходит в 100 раз быстрее, чем в этаноле. На рисунках 4, 5 представлены кинетики фотоокрашивания / фотообесцвечивания и фотодеградации образцов фотохромного лиганда (SP 1) в растворах этанола (А) и толуола (Б). При сравнении данных, полученных для растворов фотохромного соединения (SP 1) в растворе этанола и толуола видно, что их светостойкость резко повышалась при замене толуола на этанол. Максимумы $\lambda_{\text{д}}$ в спектрах поглощения спиро-форм (A) соединения (SP 1) расположены в интервале 334–337 нм и мало зависят от природы растворителя. В спектрах поглощения фотоиндуцированных окрашенных (MC) форм соединения (SP 1) наблюдается явление сольватохромизма. Из таблицы 1 видно, что максимум полосы поглощения фотоиндуцированной MC формы ($\lambda_{\text{в}}$) испытывает гипсохромное смещение с увеличением полярности растворителя, что согласуется с поведением спиропиранов в растворителях различной полярности. При этом замедляется скорость спонтанного темнового обесцвечивания MC формы и возрастает устойчивость соединения к необратимым фотопревращениям. Наименьшая константа скорости темновой релаксации и наименьшая степень фотодеградации спиропирана (SP 1) может быть объяснена образованием водородной связи между фенолятным анионом MC спиропиранового лиганда (SP 1) и молекулами этанола. Подобные

фотоиндуцированные спектральные изменения также наблюдались для этого соединения (**SP 1**) в ацетонитриле и в толуоле (табл. 1; рис. 3А, 2Б).

На рисунке 3Б показаны спектры флуоресценции фотоиндуцированной МС формы (**SP 1**) в растворе этанола, ацетонитрила и толуола. Максимумы полос находятся при 636 нм (в этаноле), при 650 нм (в ацетонитриле) и при 666 нм (в толуоле). Симбатно гипсохромному смещению полос поглощения (λ_B) наблюдался и сдвиг максимума полос флуоресценции (λ_{fl}) МС формы.

Для исследования кинетики и механизма быстрых реакций промежуточных продуктов (возбужденные состояния, изомеры, радикалы) образующихся из спиропирана (**SP 1**) был применен метод импульсного фотолиза в широком диапазоне времен (от секунд до наносекунд).

В этих экспериментах была использована уникальная полностью автоматизированная установка наносекундного лазерного фотолиза с непрерывным сканированием длины волны возбуждения в диапазоне 337–800 нм с регистрацией изменения электронного поглощения (до 0,01% с системой накопления сигнала) и люминесценции со временем разрешения до 3 нс; в магнитных полях от 0 до 4000 гаусс; в широком температурном диапазоне. Были измерены спектрально-кинетические характеристики промежуточных продуктов фотолиза соединения (**SP 1**) в этаноле и в толуоле (см. рис. 6).

Как видно из рисунка 7, при последовательном чередовании облучения образца видимым или УФ-светом величина интенсивности полосы поглощения МС формы в этаноле меняется незначительно.

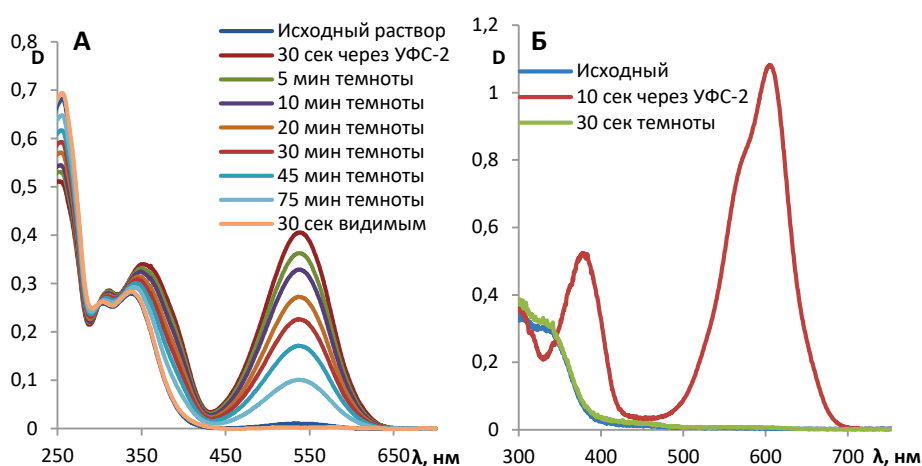


Рисунок 2. Спектры поглощения целевого фотохромного лиганда (**SP 1**) в растворе этанола (А) и толуола (Б), 25°C

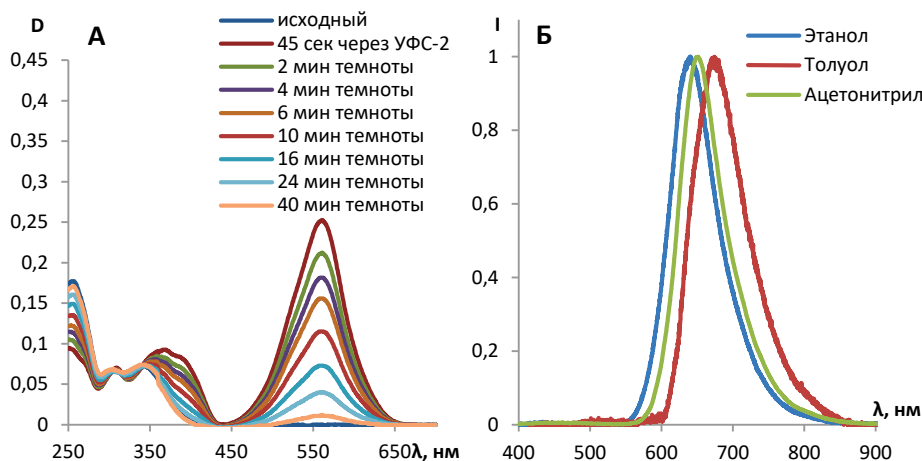


Рисунок 3. (А) Спектры поглощения фотохромного хелатофора (**SP 1**) в растворе ацетонитрила, (Б) спектры флуоресценции мероцианиновой формы фотохромного лиганда (**SP 1**) в растворах этанола, толуола и ацетонитрила, полученные при помощи модуля спектрофлуориметра USB4000-FL. Условия – 25°C, возбуждение светом ксеноновой лампы через УФС-2 фильтр – 280-370 нм

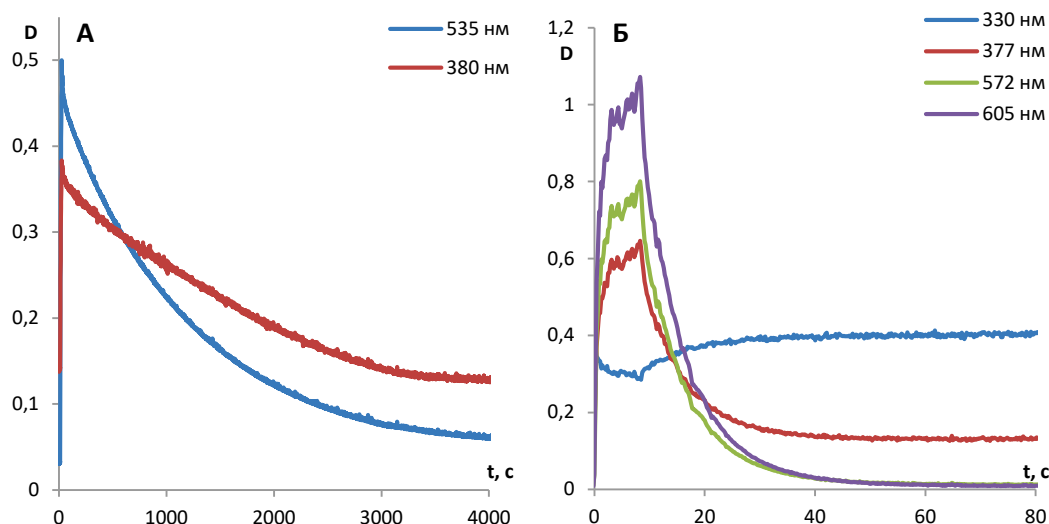


Рисунок 4. Кинетика образования и обесцвечивания фотохромного лиганда (SP 1) в растворе этанола (А) и толуола (Б), 25°C. Исследования проведены при помощи модуля спектрофотометра HR2000+ фирмы Ocean Optics (США)

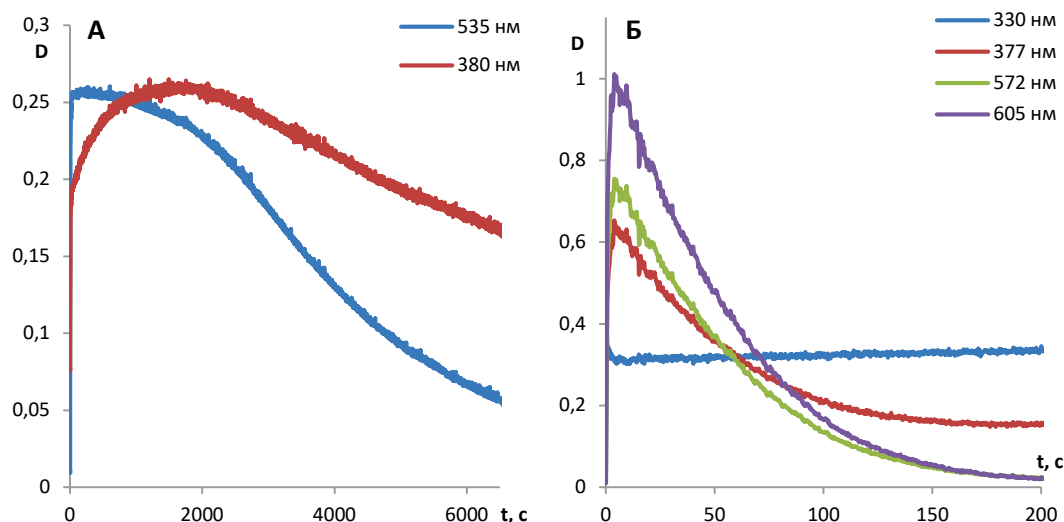


Рисунок 5. Кинетика деградации фотохромного лиганда (SP 1) в растворе этанола (А) и толуола (Б), 25 °С. Исследования проведены при помощи модуля спектрофотометра HR2000+ фирмы Ocean Optics (США)

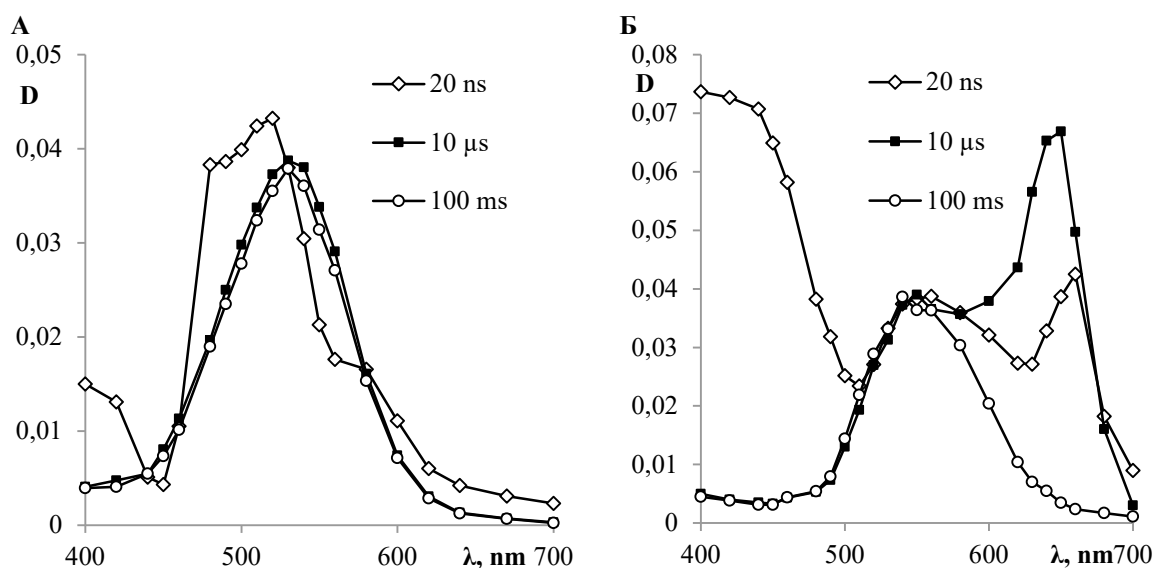


Рисунок 6. Спектры поглощения интермедиатов лазерного флеш-фотолиза фотохромного хелатофора (SP 1) в растворах этанола (А) и толуола (Б) (величина оптической плотности поглощения при 337 нм равна 0,4) через 20 нс, 10 мкс, 100 мс после лазерного импульса

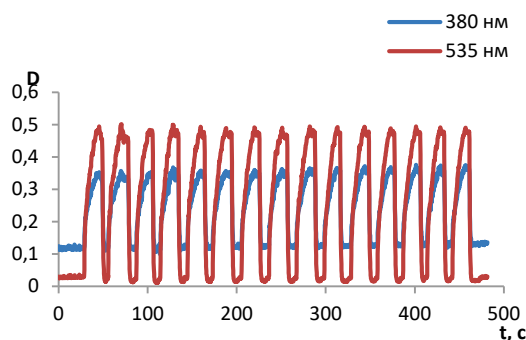


Рисунок 7. Воспроизводимость кинетики процессов фотоокрашивания / фотообесцвечивания фотохромного хелатофора (SP 1) в растворе этанола, (15 циклов)

Таблица 1. Оптические и спектрально-кинетические характеристики хелатофора (SP 1) в растворах

Растворитель	λ_A , нм	λ_B , нм	$\Delta D_B^{\text{фот}}$	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	$k_{\text{BA}}^{\text{то}}$, с^{-1}	$t_{1/2}$, с
Этанол	337	538	0,66	636	$8,73 \cdot 10^{-4}$	4000
Ацетонитрил	336	561	1,47	650	$1,29 \cdot 10^{-3}$	3000
Толуол	334	605	3,53	666	$1,23 \cdot 10^{-1}$	28

λ_A и λ_B , нм – максимумы полос поглощения исходной спиро- и фотоиндуцированной МС форм соответственно; $\Delta D_B^{\text{фот}}$ – максимальное фотоиндуцированное изменение оптической плотности в максимуме полосы поглощения фотоиндуцированной формы в состоянии фоторавновесия при одинаковой величине оптической плотности ($D \approx 0,8$) в максимуме полосы поглощения исходной формы; $k_{\text{BA}}^{\text{то}}$, с^{-1} – константа скорости реакции темнового обесцвечивания; $t_{1/2}$ – время, за которое максимальная величина фотоиндуцированной оптической плотности в максимуме полосы поглощения фотоиндуцированной формы снижается в 2 раза при непрерывном облучении растворов образца нефилтрованным светом лампы "Hamamatsu LC8".

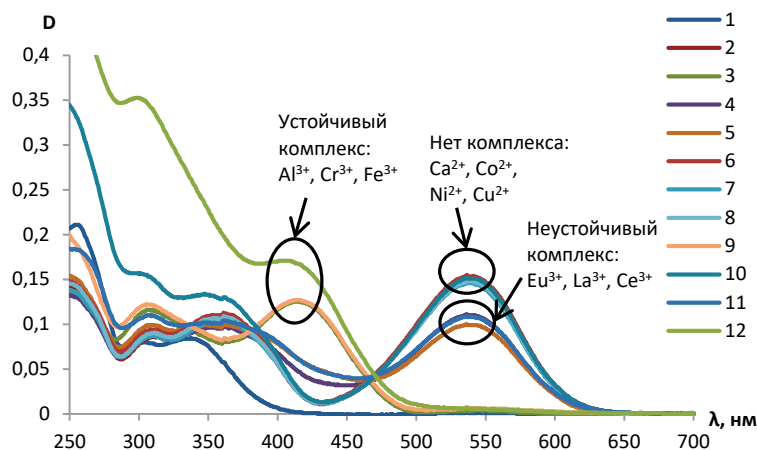


Рисунок 8. Спектры поглощения хелатофора (SP 1) в присутствии солей металлов в этаноле. Линии: 1 – спиро-форма (SP 1), 2 – фотоиндуцированная МС форма (SP 1), 3–12 – фотоиндуцированная МС форма (SP 1) в присутствии избытка соли металла (соотношение концентраций катион : SP 1 – 10:1). Используются соли металлов: 3 – $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 4 – $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, 5 – $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, 6 – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 7 – $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 8 – $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, 9 – $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, 10 – $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 11 – $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, 12 – $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

Изучение взаимодействия нового фотохромного ионофора (SP1) с солями металлов в этаноле. Получение комплексов катионов металлов со спиропирановым лигандом (SP 1). Было исследовано фотохромное поведение синтезированного соединения (SP1) в растворе этанола в присутствии катионов различной природы.

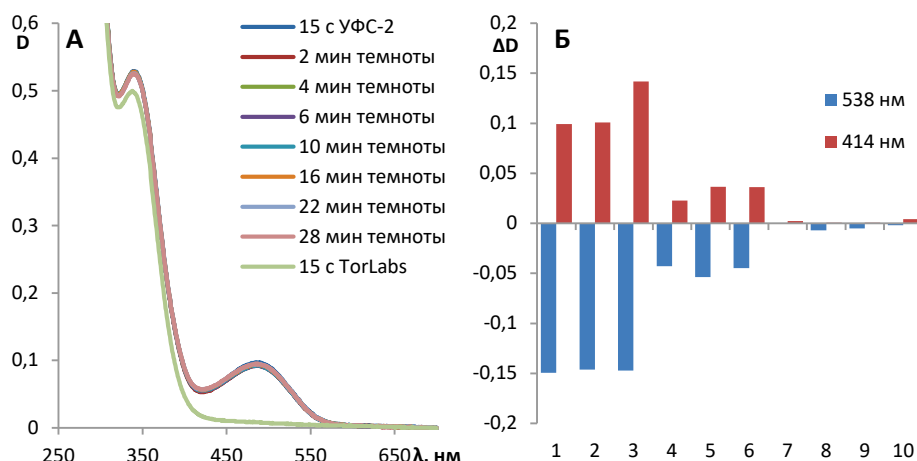


Рисунок 9. (А) Кинетика разрушения комплекса лиганда (**SP 1**) с $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ в ацетонитриле в интервале от 0 до 30 мин. Освещение образца видимым светом галогеновой лампы ThorLabs 20 Вт в течение 15 с приводит к полному разрушению комплекса. (Б) Изменения величины оптической плотности при 538 и 414 нм растворов лиганда (**SP 1**) в этаноле в присутствии солей различных металлов: 1 – $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 2 – $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, 3 – $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 4 – $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, 5 – $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, 6 – $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, 7 – $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 8 – $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 9 – $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, 10 – $\text{Cu}(\text{OAc})_2$

В качестве солей были использованы нитраты и ацетаты двух- и трехвалентных металлов (Ca, Co, Ni, Cu, Al, Cr, La, Fe, Eu, Ce) в соотношении лиганд (**SP 1**) – Me^{n+} 1:10).

Так как закрытая спиро-форма лиганда (**SP 1**) неспособна к самопроизвольному образованию комплексов с солями металлов в темноте, необходимо было предварительное генерирование MC формы освещением образца светом ксеноновой лампы через светофильтр УФС-2 – (280-370 нм).

Комплексы фотохромного лиганда с катионами металлов получали добавлением от 1 до 10 эквивалентов солей одно-, двух- и трехвалентных металлов к раствору 1 эквивалента лиганда в этаноле и последующей засветкой образца светом ксеноновой лампы фирмы Hamamatsu модель Lightingcure – LC8 (Hamamatsu, Япония) через светофильтр УФС-2. Процесс комплексообразования контролировали при помощи регистрации спектров поглощения в диапазоне длин волн 350 – 700 нм.

После добавления растворов катионов к раствору фотоиндуцированной MC-формы спиропирана (**SP 1**) в ряде случаев для солей Al, Cr, Fe, наблюдали сильный гипсохромный сдвиг максимума полосы поглощения (разница максимумов полос поглощения фотоиндуцированных форм соединения (**SP 1**) и его комплексов с катионами, $\Delta\lambda_{\text{в}}$, приблизительно 120 нм) (см. рис. 8, 9).

Об образовании комплекса свидетельствовал гипсохромный сдвиг основной полосы поглощения фотоиндуцированной MC формы $\Delta\lambda_{\text{в}} = \lambda_{\text{в(свободный лиганд)}} - \lambda_{\text{в(комплекс)}}$. Наиболее значительные величины $\Delta\lambda_{\text{в}}$ наблюдали для комплексов с трехвалентными катионами металлов (до 120 нм). Соединение (**SP 1**) образовывало фотоуправляемые системы с катионами металлов с определенной селективностью. Наблюдалась выраженная селективность ионофорного фрагмента молекулы хелатофора (**SP 1**) к образованию комплексов с солями трехвалентных катионов. Комплексы обладали различной стабильностью в темноте, но мгновенно разрушались при освещении видимым светом или под действием растворов HCl в метаноле или EDTA.

Совпадение максимумов полос поглощения фотоиндуцированной MC формы с максимумом полосы поглощения этой формы в растворе, содержащем ионы металла, свидетельствует об отсутствии в растворе комплексов с этим катионом.

Таким образом, впервые было показано, что лиганд (**SP 1**) с ионофорным иминодиацетатным фрагментом обладает фотоуправляемыми сенсорными свойствами на катионы металлов.

Полученные результаты открывают дополнительные перспективы для использования новых фотохромов на основе функционализированных спиропиранов в качестве новых гибридных материалов для создания на их базе: детекторов металлов, компонентов фотохромных систем и прототипов smart-устройств молекулярной электроники.

Работа была частично поддержана РФФИ (проект № 20-03-00139) и была выполнена в рамках Государственного задания ИБХФ РАН 2024 года (тема №122041300210-2).

Список литературы / References:

1. *Organic Photochromic and Thermochromic Compounds*. Eds. Crano J.C., Gugliemetti R.J. N.Y., London: Plenum Press, 1999, vol. 1-2, DOI: 10.1007/b114211.
2. Khodonov A.A., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Laptev A.V., Barachevsky V.A., Varfolomeev S.D., Demina O.V. 5'-Substituted Indoline Spiropyran: Synthesis and Applications. *Colorants*, 2023, vol. 2, pp. 264-404, doi: 10.3390/colorants2020017.
3. *Photochromic Materials: Preparation, Properties and Applications*. Eds. Tian H., Zhang J., He T. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2016, doi: 10.1002/9783527683734.

4. *Molecular Switches*. Eds. Feringa B.L., Browne W.R., 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2011, doi: 10.1002/9783527634408.
5. Sahoo P.R., Prakash K., Kumar S. Light Controlled Receptors for Heavy Metal Ions. *Coordination Chemistry Rev.*, 2018, vol. 357, no. 1, pp. 18-49, doi: 10.1016/j.ccr.2017.11.010.
6. Coudret C., Chernyshev A.V., Metelitsa A.V., Micheau J.C. *New Trends in Spiro-compounds Photochromic Metals Sensors: Quantitative Aspects*. In: Photon-Working Switches. Eds. Yokoyama Y., Nakatani K. Tokyo: Springer, 2017, ch. 1, pp. 3-36, doi: 10.1007/978-4-431-56544-4_1.
7. Kortekaas L., Browne W.R. Spiropyran-Multifaceted Chromic Compounds. In: *Molecular Photoswitches*. Ed. Pianowski Z.L. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2022, pp. 131-149.
8. Ali A.A., Kharbush R., Kim Y. Chemo- and Biosensing Applications of Spiropyran and Its Derivatives. A Review. *Anal. Chim. Acta*, 2020, vol. 1110, pp. 199-223, doi: 10.1016/j.aca.2020.01.057.
9. Kubinyi M., Varga O., Baranyai P., Kallay M., Mizsei R., Tarkanyi G., Vidoczy T. Metal complexes of the merocyanine form of nitrobenzospiran: Structure, optical spectra, stability. *J. Mol. Structure*, 2011, vol. 1000, pp. 77-84, DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.05.055.
10. *Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function*. In: *Neuromethods*. Eds. Chambers J.J., Kramer R.H. Springer, 2011, vol. 55, DOI: 10.1007/978-1-61779-031-7_1.
11. Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Новые фотоактивируемые метки и материалы для бионанопотоники. М: Издательский дом «Научная Библиотека». Под ред. Варфоломеева С.Д., Курочкина И.Н. В кн. Биохимическая физика сегодня. 2024, гл. 26, с. 509-525 [Demina O.V., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. *New photoactivated labels and materials for bionanophotonics*. M: Publishing house "Scientific Library". Ed. Varfolomeev S.D., Kurochkin I.N. In the book *Biochemical physics today*. 2024, ch. 26, pp. 509-525, doi: 10/368871/978-5-907954-06-9 (In Russ.)].
12. Демина О.В., Беликов Н.Е., Мельникова И.А., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Новые метки и зонды для решения задач бионанопотоники. *Химическая физика*, 2019, т. 38, № 12, с. 44-47 [Demina O.V., Belikov N.E., Melnikova I.A., Lukin A.Yu., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. *New Labels and Probes for the Application in Bionanophotonics*. *Russ. J. Physical Chemistry, B*, 2019, vol. 13, no. 6, pp. 938-941, doi: 10.1134/S1990793119060162 (In Russ.)].
13. Звездин К.В., Беликов Н.Е., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Демина О.В., Левин П.П., Бричкин С.Б., Спирин М.Г., Разумов В.Ф., Швеиц В.И., Ходонов А.А. Новые гибридные фотохромные материалы с переключаемой флуоресценцией. *Российские нанотехнологии*, 2012, т. 7, № 5-6, с. 112-118 [Zvezdin K.V., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Levin P.P., Brichkin S.B., Spirin M.G., Razumov V.F., Shvets V.I., Khodonov A.A. *New Hybrid Photochromic Materials with Switchable Fluorescence*. *Nanotechnologies in Russia*, 2012, vol. 7, no. 5-6, pp. 308-317, DOI: 10.1134/S1995078012030172 (In Russ.)].
14. Беликов Н.Е., Демина О.В., Левина И.И., Лукин А.Ю., Сафинова А.Я., Петровская Л.Е., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Фотохромные лиганды для модификации катионов металлов и квантовых точек. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 113-122 [Belikov N.E., Demina O.V., Levina I.I., Lukin A.Yu., Safinova A.Ya., Petrovskaya L.E., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. *Study of the technology of the recombinant target protein selective labeling and development of the synthetic routes for the modified CdTe quantum dots synthesis in aqueous solutions*. *Russ. J. Biol. Phys. Chem.*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 113-122, doi: 10.29039/rusjbpc.2022.0492. (In Russ.)].
15. Беликов Н.Е., Демина О.В., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Складнев Д.А., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Исследование технологии селективного маркирования рекомбинантных белков-мишеней и разработка путей синтеза модифицированных квантовых точек CdTe в водных растворах. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 88-96 [Belikov N.E., Demina O.V., Lukin A.Yu., Petrovskaya L.E., Skladnev D.A., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. *Study of the technology of the recombinant target protein selective labeling and development of the synthetic routes for the modified CdTe quantum dots synthesis in aqueous solutions*. *Russ. J. Biol. Phys. Chem.*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 88-96 (In Russ.)].
16. Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Швеиц В.И., Демина О.В., Барачевский В.А., Ходонов А.А. 5-Формил-замещенные индолиновые спиробензопираны и способ их получения. Патент РФ № 2358977. Опубликовано 20.06.2009, Бюл. из. № 17 [Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Shvets V.I., Demina O.V., Barachevsky V.A., Khodonov A.A. *5-Formyl-substituted indoline spirobenzopyrans and the method for their preparation*. Russian Federation Patent No. 2358977. Published 20.06.2009, Bulletin no. 17 (In Russ.)].

INFLUENCE OF METAL SALTS ON THE OPTICAL PROPERTIES OF A NEW PHOTOCHROMIC CHELATOPHORE

Belikov N.E.¹, Demina O.V.¹, Lukin A.Yu.², Varfolomeev S.D.¹, Khodonov A.A.¹¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS

Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: khodonov@gmail.com

² MIREA – Russian Technological University

Vernadsky ave., 78, Moscow, 119454, Russia

Received 13.07.2025

Abstract. This paper presents the results of the studies conducted by the authors aimed at developing methods for preparation of new photochromic chelatophores capable of photocontrolled interaction with inorganic components. In the work, special attention was paid to the selection of the desired structure of the photochrome molecule and the practical implementation of the laboratory technology for the synthesis of the target compound with specified optical parameters. To ensure selective binding of the chelatophore with cations or other types of charged ligands, a "molecular address" was introduced into the C5'-position of the molecule through a methylene bridge - a fragment of diethyl ether iminodiacetate, which has the ability to interact with various metal cations. The paper also presents the results of studying the photochromic behavior of the chelatophore and the selectivity of its complexation processes with various metal salts. The study of the spectral characteristics of the new chelatophore showed that it exhibits pronounced photochromism. With further irradiation of the sample with visible light, this band quickly disappears. The target photochrome formed photocontrolled complexes with metal cations with a certain selectivity. A pronounced selectivity of the ionophore fragment of the chelatophore molecule to form complexes with salts of trivalent cations was observed. The obtained results open up prospects for the use of new photochromes based on functionalized spiropyranes as new hybrid materials for creating sensors and metal detectors, components of photochromic systems and prototypes of smart devices for molecular electronics on their basis.

Key words: photochromic chelatophores and ionophores, spiropyranes, metal cations, complexation.

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ЛИПИДОВ В ТКАНЯХ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *POLITITAPES AUREUS* (GMELIN, 1791) В СУБЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ СЕВАСТОПОЛЬСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ

Бородина А.В.¹, Пименов К.А.¹, Веляев Ю.О.²

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

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию 19.07.2025

Аннотация. Данная работа посвящена особенностям накопления липидов малоизученного вида двустворчатых моллюсков - *Polititapes aureus*, широко распространенного на песчано-иловом грунте, в прибрежной, сублиторальной зоне Севастополя. В работе представлены результаты исследования общих липидов (ОЛ), а также фосфолипидов (ФЛ), моно-, диглицеридов и стеролов (ДГ+ст), свободных жирных кислот, триацилглицеринов (ТАГ) в тканях ноги, жабр, гепатопанкреаса (ГП), а также состава жирных кислот (ЖК) ОЛ суммы тканей *P. aureus*. Исследования проводились в весенний период, когда начинается годовой цикл моллюска. При исследовании липидов двустворчатого моллюска *P. aureus* в весенний сезон уровень ОЛ соответствовал $1,1 \pm 0,1$ г/100 г сырого веса тканей. В распределении ОЛ обнаружена тканеспецифичность: накопление липидов в гепатопанкреасе превышало в 3 раза (ГП – $16,4 \pm 0,8$ г/100 г сырого веса тканей), ткани ноги и жабр. Содержание классов липидов во всех тканях были близкими по значениям, вместе с тем можно выделить некоторые отличия между исследуемыми тканями: низкое значение ФЛ ($19,5 \pm 3,6\%$) и наиболее высокое МГ ($5,9 \pm 1,0\%$) в ноге моллюска, наиболее высокое значение ДГ+Ст в ГП – $30,9 \pm 3,9\%$, а также высокие значения ТАГ в ноге и жабрах ($17,5 \pm 2,3$; $17,2 \pm 3,8$; соответственно). В сумме всех тканей было обнаружено 23 ЖК и 5 стеридов. В составе ЖК обнаружено 11 – насыщенные ЖК, с доминирующей 16:0 ($25,0 \pm 1,3$), 5 – Мононенасыщенные ЖК, с доминирующей 18:1 ω -9-cis ($10,6 \pm 0,5$), 7 – полиненасыщенные ЖК, с доминирующей 20:5 ω -3 ($12,0 \pm 0,6$). Среди стеридов, доминировал холестерин – $63,4 \pm 3,2\%$ от общей суммы стеридов и ЖК.

Ключевые слова: *Polititapes aureus*, липиды, жирные кислоты, стиролы, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Морские организмы, благодаря своему биоразнообразию, являются богатыми природными источниками таких биологически активных веществ как полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), стериды, белки, полисахариды, каротиноиды и др. Многие из таких организмов живут в экстремальных условиях и при адаптации вырабатывают ряд вторичных метаболитов, относящихся к биологически активным веществам, с уникальными свойствами, которые не встречаются в других организмах. Среди таких гидробионтов по своей биологической ценности двустворчатые моллюски занимают одно из лидирующих мест [1]. Особое место среди БАВ уделяется исследованию устойчивых, доступных и полезных для человека липидов, и, в том числе, ПНЖК (омега 3,6,7,9), которые можно получить из двустворчатых моллюсков [2,3]. Липиды в организме играют важную роль: образуют энергетический резерв, создают защитный термоизоляционный покров и защищают организм от химических воздействий. В клетках они являются одним из основных компонентов клеточных мембран, влияют на их проницаемость, участвуют в передаче нервного импульса, выполняют роль вторичных мессенджеров в передаче сигналов в клетку. Общие липиды (ОЛ) моллюсков чаще всего разделяют на классы: фосфолипиды (ФЛ), моноглицериды (МГ), диглицериды (ДГ), стериды, холестерин, СЖК, триацилглицерины (ТАГ), холестериновые эфиры [4,5]. За каждым классом закреплены определенные функции в организме [4,6-8]. За эфирами липидов закреплены структурные функции, а также они могут играть роль эндогенных антиоксидантов, участвовать в дифференцировке клеток и сигнальных путях [4]. Моллюски прибрежной зоны, постоянно подвергаются перепадам температуры, солености, находясь в приливно-отливной зоне, часто находятся в состоянии гипоксии, аноксии. Эти адаптационные процессы существенно влияют на изменение соотношений структурных и запасных липидов, а также состава ЖК [5,9]. Так, например, при воздействии низких температур ($0 - +3$ °C) у мидий *M. edulis* наблюдается увеличение концентрации ФЛ, в частности, содержание арахидоновой ЖК (20:4(n-6)) в составе ФЛ, а также происходит снижение содержания ТАГ, а при повышении температуры до $+8$ °C наблюдался рост концентрации ТАГ и ЖК 16:0 и 20:1n 7 в составе ФЛ [10]. Двустворчатые моллюски абсорбируют из пищи и включают в свой метаболизм ПНЖК. Например, наличие в моллюске насыщенных и мононенасыщенных C14–C18 жирных кислот, указывают на наличие в пище моллюска детрита, а наличие насыщенных C14–C16 кислот, бактериальной флоры, при этом часто простейшие инфузории и жгутиконосцы, содержат арахидоновую, эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты и обладают способностью синтезировать эти эссенциальные липидные компоненты [11,12]. Высокое содержание насыщенных ЖК, таких как C20 характерно для

двустворчатых моллюсков, распространенных в среде, богатой органическим веществом бактериального происхождения, по сравнению с теми же моллюсками, которые в основном питаются фитопланктоном, в котором доминируют *n*-3 полиненасыщенные ЖК C18 и C22 [9,11]. Многие двустворчатые моллюски содержат редкие неметиленразделенные ЖК (далее – НМРЖК). Так, неметиленразделенные ЖК были выделены из липидов моллюска *Calypptogena phaseoliformis*, живущего в глубоководных гидротермальных вентх [13], а также из мидий Белого моря [9]. Несмотря на то, что информации об этих ЖК не так много, известно, что они играют особую структурную и функциональную роль в биологических мембранах при окислительных процессах [14].

Представляют интерес и стерины. Они являются маркерами некоторых биохимических процессов, проходящих в организме, в том числе, готовности этих организмов к размножению [15]. Эти соединения могут играть важную роль для пищеварительной системы человека, передаваясь по пищевой цепи от моллюска к человеку [16]. Исходя из состава стерина в тканях моллюсков, можно судить о его питании, в частности о количестве диатомовых водорослей в его рационе [17], а также в совокупности с оценкой жирнокислотного состава можно судить об антропогенной нагрузке в среде его обитания [18]. Особое внимание в современных исследованиях уделяется изучению различных контаминантов-загрязнителей, маркеров микропластика [19], в частности, различным двухосновным карбоновым кислотам, которые попадают в моллюски в следствии антропогенного воздействия.

Одни и те же виды двустворчатых моллюсков, обитая в разных условиях, в разных морских акваториях, могут накапливать как общие липиды, так и отличительные ЖК в составе как нейтральных, так и полярных липидов [20,21]. Например, виды *Venerupis* и *Ruditapes* sp широко распространены помимо Российского побережья, вдоль западного побережья США и Канады вплоть до севера Британской Колумбии, Франции, Соединенного Королевства и Испании, Италии, Китая, Турции, Туниса и Египта и добываются через рыболовный промысел в этих странах [22-24]. В Чёрном море *P. aureus* встречается на песчаных грунтах и достигает в длину до 50 мм (высота до 35 мм), а на Крымском побережье распространен на северо-западном и западном побережье [25]. Исследований биологической ценности этого вида моллюсков в Черноморском регионе очень мало [26]. Сведения о составе липидов этого вида в черноморском регионе не встречаются.

Целью данной работы было исследовать особенности накопления некоторых липидов (общих липидов, фосфолипидов, моноглицеридов, диглицеридов и стерина, свободных жирных кислот, триацилглицеринов) в тканях ноги, жабр, гепатопанкреаса двустворчатого моллюска *P. aureus* в весенний период, а также изучить полный состав жирных кислот и стерина этого вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись двустворчатые моллюски *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791), обитающие на песчано-иловом грунте бухты Казачья (г. Севастополь), в Чёрном море [25]. Исследования проводились весной, пробы отбирались 2-3 раза в месяц, ежемесячно. У моллюсков препарировали ткани ноги, жабр, гепатопанкреаса (ГП), затем определяли ОЛ методом Фолча, адаптированным к нашим объектам исследований [27]. Результаты определения ОЛ представляли в граммах на 100 граммов сырого веса ткани (г с.в. ткани).

После определения ОЛ сухие экстракты липидов растворяли в хлороформе для дальнейшего разделения с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на классы липидов: ФЛ, МГ, ДГ+Стерины, СЖК и ТАГ методом, описанным ранее [27]. Диглицерины и стерины по своей хроматографической подвижности очень близки, поэтому в работе приводится их суммарное содержание.

Для анализа использовали пластинки Sorbfil Plates ПТСХ-АФ-А (Краснодар, Россия), обработанные 10% спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты, сушили под струей воздуха и хранили в эксикаторе до использования до 3 суток. После нанесения пробы (1-5 мг липидов), рядом наносили стандарты ФЛ и ТАГ. В качестве стандарта на ТСХ для ТАГ мы использовали государственный стандартный образец ГСО-9437-2009 (жиры); а для ФЛ – Лецитин (BioChemica). После хроматографического разделения пластины сушили и проявляли в термостате при $t=100^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин.

Количественная обработка результатов ТСХ проводилась денситометрически [27]. С помощью сканера HP Scanjet 200 сканировали полученное изображение на ТСХ и проводили расчет концентраций с помощью программы «ТСХ менеджер 4.0.2.3D» (разработка Плахотный И.Н., www.garryc.chat.ru).

Хроматографические методы и масс-спектрометрия. Определение состава ЖК проводили весной. Хромато-масс-спектрометрическое исследование выделенных экстрактов ОЛ на содержание ЖК проводилось в НИЛ «Молекулярная и клеточная биофизика» ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет» с использованием хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000» с масс-спектрометрическим детектором. В качестве пробоподготовки пробу метилировали. Метилирование выделенной фракции ОЛ проводилось по описанной ранее методике [27-29]. Объём вводимой пробы составлял 1 мкл. Разделение компонентов пробы проводили с помощью капиллярной колонки HP-5MS UI (Agilent). Длина колонки – 30 м, а внутренний диаметр – 0,25 мм. Толщина неподвижной фазы - 0,25 мкм. В качестве газа-носителя использовали гелий марки 6,0, расход которого составлял 1 мл/мин. Температурный режим колонки - градиентный с начальной температурой 80°C , изотермой 2,0 мин и нагревом $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 280°C . На испарителе деление потока соответствовало 20:1, температура 280°C . Анализ проводили с использованием масс-спектрометрического детектора с электронной ионизацией (70 эВ) и температурой ионного источника 230°C . Температура переходной линии составляла 280°C . Полученный спектр

регистрировали в диапазоне масс от 30 до 650 m/z. Для обработки полученной хромато-масс-спектрометрической информации использовали программное обеспечение Хроматэк Аналитик 3.1 (сборка 3.1.2211.3), NIST MS Search v.3.0 и библиотека масс-спектров - NIST 2023 с базой данных от 18 апреля 2023 года. Каждое соединение, представленное в результатах, было идентифицировано путем соотнесения ее метилового эфира, образующегося при этерификации карбоксильной группы, с исходной формулой кислоты из открытых баз данных. Единицы измерения, в которых приводится содержание компонентов, характеризуются как отношение площади пика индивидуального соединения к сумме площадей всех размеченных на хроматограмме пиков.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов (описательная статистика, дисперсионный анализ) выполняли с применением программы Grapher 7. Количественное определение липидных фракций ФЛ, ДГ+ Ст, СЖК, ТАГ представлены в единицах измерения % от ОЛ. Все результаты представлены как среднее и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), средние значения считались значимыми при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

После отбора проб, вскрытия раковин, весной, ткани моллюсков выглядели, как показано на рисунке 1.

На фотографии ткани моллюска *P. aureus* типичного цвета, желтым цветом выделяется генеративная ткань, что свидетельствует о начале репродуктивного цикла моллюска. Гепатопанкреас находится под ногой моллюска, он темно-зеленого цвета.

Содержание ОЛ в сумме тканей моллюска *P. aurea* в весенний период составлял $1,11 \pm 0,12$ г·100 г⁻¹ сырого веса тканей. Распределение липидов по тканям было не равномерным: в ноге – $4,9 \pm 0,6$; в жабрах – $4,7 \pm 0,7$; в ГП – $16,4 \pm 0,8$ г·100 г⁻¹ сырого веса тканей соответственно (рис. 2). Высокое содержание липидных соединений в пищеварительной железе у двустворчатых моллюсков встречается часто и характерно для многих видов [30]. Это основной орган метаболических реакций, что делает его особым местом для накопления различных соединений липидной природы. Гепатопанкреас у моллюсков сочетает в себе свойства печени и поджелудочной железы, выполняет функции пищеварения, нейтрализации токсических соединений, поступающих в организм с

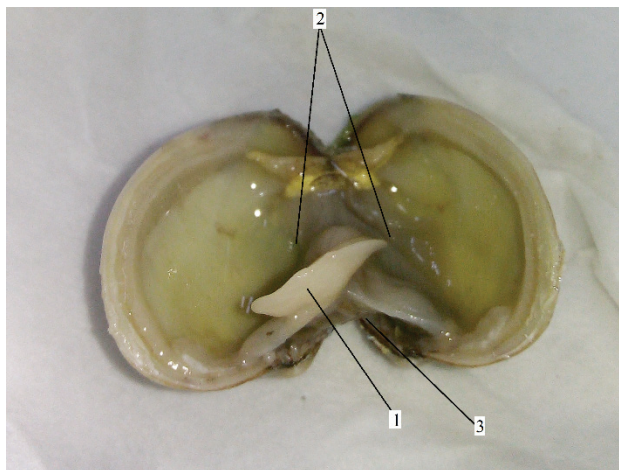


Рисунок 1. Фото тканей *P. aureus* (апрель): 1 – нога, 2 – жабры, 3 – гепатопанкреас

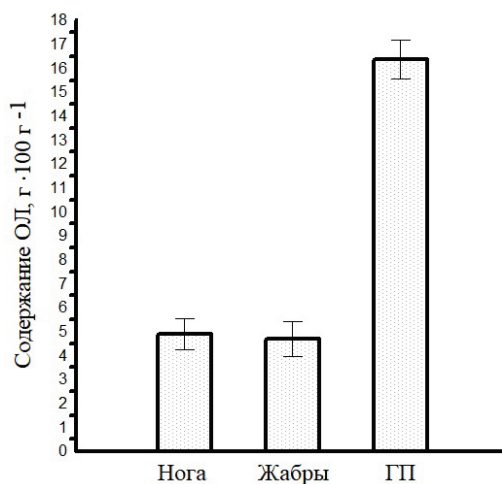


Рисунок 2. Содержание ОЛ в ноге, жабрах, гепатопанкреасе моллюска *P. aurea* в весенний период

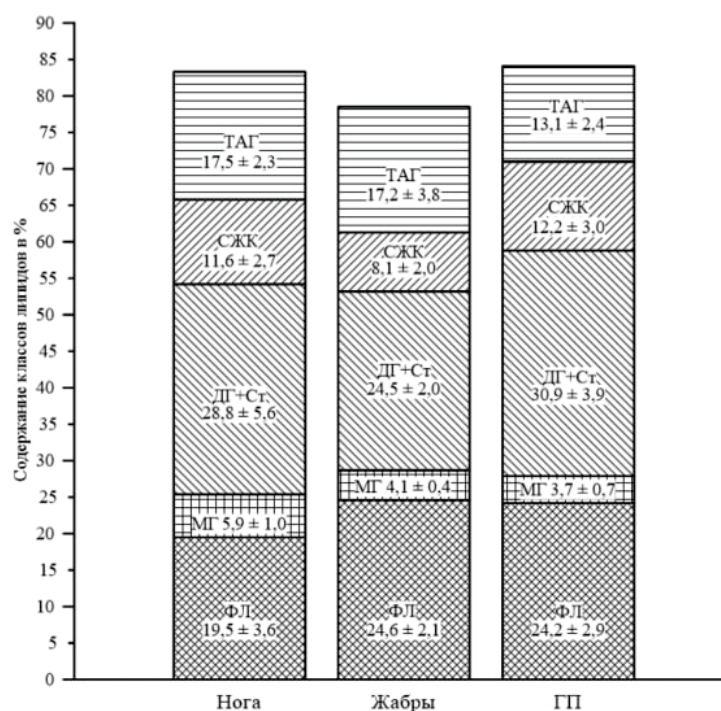


Рисунок 3. Распределение классов липидов по тканям ноги, жабр, гепатопанкреаса моллюска *P. aureus* весной

пищевыми массами, биоаккумуляции и детоксикации различных химических соединений. При старении организма в клетках печени существенно снижается энергетическая функция митохондрий [38].

Распределение классов липидов по тканям носило более равномерный характер (рис. 3).

Классы общих липидов. ФЛ являются структурными компонентами клеточных мембран, транспортных фосфолипидопотеинов. Они также выступают в роли энергетического материала клеток, выполняют регуляторную функцию. В неблагоприятных условиях ФЛ расходуются на восстановление структурных клеточных мембран. В период покоя, при низких температурах, коротком световом дне происходит наибольшее накопление ФЛ и их восстановление в тканях. Весной снижение этого показателя связывается с нарастающей активностью и нагрузкой на организм моллюска. Наиболее низкое значение в ноге ($19,5 \pm 3,6\%$), как в мышечном органе, по сравнению с другими видами тканей, возможно вызвано наиболее активным образом жизни в этот период года.

МГ являются производными жирных кислот и глицерина, участвуют в накоплении энергии, являются предшественником диглицеридов и триглицеридов [7,10], главным образом, свидетельствуют о богатой жирами пище. Наиболее выражен этот показатель в ноге моллюска ($5,9 \pm 1,0\%$).

ДГ – класс липидов, отвечающий за накопление энергии, являются прекурсорами ТАГ, ФЛ, а также являются участниками внутриклеточных процессов (участник активации переноса протеинкиназы С) [7,29]. Стерины (Ст.), стеролы, циклические спирты, относящиеся к классу стероидов, широко распространены в живой природе, относятся к запасным липидам. Эти высокомолекулярные циклические спирты, принадлежат классу липидов, от которых зависят многие биологические процессы в организме, а также структура клеточных мембран. Эти вещества, в частности холестерин, необходимы для поддержания стабильности клеточной мембраны. Холестерин отвечает за целостность мембраны и ее устойчивость к температурным перепадам [10,38]. Содержание ДГ+Ст во всех тканях составляла около трети всех липидов, однако ниже всего этот показатель был в жабрах: $24,5 \pm 2,0\%$, а самый высокий в ГП – $30,9 \pm 3,9\%$.

СЖК называют жирные кислоты, находящиеся в незатерифицированной форме; иногда их называют незатерифицированными жирными кислотами. Их количество повышается при наличии жирной пищи в рационе питания, снижается при наличии пищи, обедненной жиром. Утилизируются СЖК гепатопанкреасом и мышечной тканью. Жирные кислоты (в особенности это касается пальмитиновой, олеиновой и линолевой кислот) откладываются в жировой ткани в виде ТАГ. Скорость обмена СЖК чрезвычайно высока: каждую минуту утилизируется 20-40% СЖК - они окисляются, ретерифицируются или превращаются в другие жирные кислоты. Во время покоя окисление происходит, в основном, в ГП, а при нагрузках – в мышечной ткани. Большинство СЖК, захваченных клетками ГП, ретерифицируется с образованием ТАГ, а также ФЛ, для синтеза которых используется, как правило, линолевая кислота. Накопление СЖК в тканях происходило примерно одинаково, достоверных отличий не наблюдалось. Снижение СЖК в тканях может быть связано с процессом ретерификации с образованием ТАГ и ФЛ для нужд организма или снижения пищевого разнообразия. СЖК принято относить к запасным липидам. Этот показатель был равномерным во всех тканях, его содержание колебалось около 8-12%.

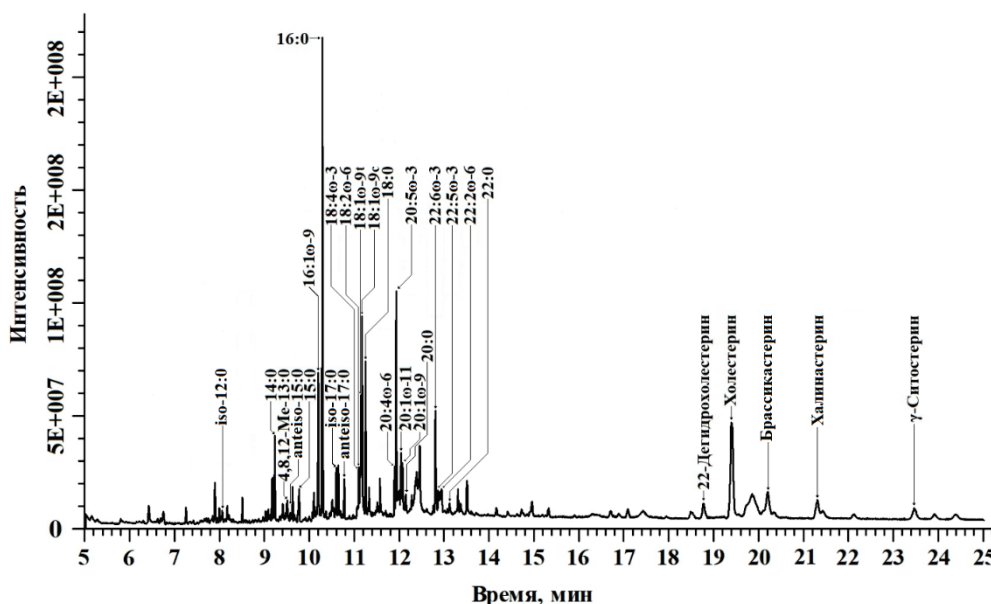


Рисунок 4. Хроматограмма экстракта общих липидов суммарных тканей моллюска *P. aureus*

ТАГ – нейтральные липиды – являются наиболее распространенными в природе источниками энергии, имеющими липидную основу. Они представляют собой сложные эфиры, образованные глицерином и жирными кислотами. У ТАГ выражена резервно-энергетическая, механическая и теплосберегающая функция в организме, относятся к запасным липидам [8]. В исследуемых тканях моллюска *P. aureus* наиболее высокие показатели ТАГ весной приходились на ногу и жабры ($17,5 \pm 2,3$; $17,2 \pm 3,8$; соответственно), что вероятно объясняется в целом обилием пищевого спектра и наступающим потеплением.

Исследование ЖК общих липидов всех тканей моллюска *P. aureus*. Состав метиловых эфиров жирных кислот и стерина фракции ОЛ всех тканей моллюска исследованы методом хромато-масс-спектрометрии.

Хроматограмма ОЛ показана на рисунке 4. Относительные количественные параметры жирнокислотного состава представлены в таблице 1.

Всего было обнаружено 23 ЖК и 5 стерина. Из них было выявлено 11 НЖК. Основными из них являются миристиновая (14:0), пальмитиновая (16:0) и стеариновая (18:0). Остальные насыщенные жирные кислоты содержатся в небольших количествах. К таким кислотам относятся 4,8,12-триметилтридекановая (4,8,12-Me-13:0), изолауриновая (iso-12:0), сарциновая (anteiso-15:0), пентадекановая (15:0), изомаргаринаовая (iso-17:0), антеизомаргаринаовая (anteiso-17:0), эйкозановая (20:0) и докозановая (22:0) кислоты. Также было определено 5 МНЖК и 7 ПНЖК. Из этих кислот было идентифицировано четыре омега-3 (стеариноновая (18:4ω-3), эйкозапентаеновая (20:5ω-3), докозагексаеновая (22:6ω-3) и докозапентаеновая кислоты (22:5ω-3), три омега-6 (линолевая (18:2ω-6), арахидоновая (20:4ω-6) и 13,16-докозодиеновая кислоты (22:2ω-6) и четыре омега-9 кислоты (олеиновая (18:1ω-9-*cis*), элаидиновая (18:1ω-9-*trans*), гипогейиновая (16:1ω-9) и гондоевая (20:1ω-9) кислоты). Суммарное содержание ценных (%) омега-3 составляет – 21,7, омега-6 – 5,6, омега-9 – 19,6%.

Стоит отметить, что данный моллюск содержит достаточно большое количество ценных для здоровья человека жирных кислот. Некоторые из них, как например омега-3 жирные кислоты не синтезируются нашим организмом [32]. Огромное влияние на здоровье животных и человека оказывает докозагексаеновая кислота [31-32], которая присутствует в данном гидробионте. Она оказывает благотворное влияние на регулирование уровня ТАГ, общего холестерина, резистентности к инсулину, кровяного давления, печеночных ферментов, маркеров воспаления и окислительного стресса. Кроме того, имеются доказательства её потенциальной пользы с точки зрения функции митохондрий, регуляции уровня липопротеидов плазмы и снижения риска внезапных сердечно-сосудистых осложнений, связанных с разрывом атеросклеротической бляшки [34]. Омега-6 жирные кислоты необходимы человеку для поддержания на нормальном уровне деятельности сердечно-сосудистой системы [35]. Те же омега-9 жирные кислоты встречаются в пищевых продуктах в достаточно низком количестве, но при этом обладают противовоспалительными свойствами, благоприятно влияют на работу зрительного аппарата, печени и ряда других систем человека [36,37]. Многие из данных ПНЖК всасываются нашим желудочно-кишечным трактом через специфические белки [38], находящиеся в эпителии стенок кишечника и в дальнейшем участвуют в биосинтезе различных тканей человека, локализуясь в основном в клеточных мембранах. Таким образом, исходя из высокого содержания ПНЖК (18:4ω-3; 18:2ω-6; 20:4ω-6; 20:5ω-3; 22:6ω-3) у *P. aureus* можно говорить о его высокой пищевой ценности для млекопитающих и человека.

Таблица 1. Состав жирных кислот суммы тканей моллюска *P. aureus*

Вещество	Время выхода, мин	Доля, % от общего содержания ЖК и стерин
Ненасыщенные жирные кислоты		
iso-12:0	8,06	0,4±0,02
14:0	9,23	3,6±0,2
4,8,12-Me-13:0	9,51	0,7±0,04
anteiso-15:0	9,57	0,2±0,01
15:0	9,77	0,9±0,05
16:0	10,28	25,0±1,3
iso-17:0	10,59	1,9±0,1
anteiso-17:0	10,77	2,2±0,1
18:0	11,24	7,8±0,4
20:0	12,14	0,9±0,1
22:0	13,11	0,6±0,03
Сумма:		44,2±2,2
Мононенасыщенные жирные кислоты		
16:1ω-9	10,19	6,9±0,3
18:1ω-9- <i>trans</i>	11,14	5,3±0,2
18:1ω-9- <i>cis</i>	11,17	10,6±0,5
20:1ω-11	12,03	3,7±0,2
20:1ω-9	12,07	2,1±0,1
Сумма:		28,5±1,4
Полиненасыщенные жирные кислоты		
18:4ω-3	11,10	1,8±0,1
18:2ω-6	11,12	1,8±0,1
20:4ω-6	11,89	2,6±0,1
20:5ω-3	11,92	12,0±0,6
22:6ω-3	12,79	6,8±0,3
22:5ω-3	12,86	1,0±0,1
22:2ω-6	12,91	1,2±0,1
Сумма:		27,2±1,4

Важным компонентом данного моллюска являются стерин, которые в достаточно значимом количестве были обнаружены в составе тканей *P. aureus*. В общей сумме нами было обнаружено и идентифицировано пять соединений, относящихся к данному классу, в количестве, приведённом в таблице 2. Согласно последним исследованиям, данные соединения играют активную роль в иммуномодулирующей функции тканей, поэтому они достаточно интересны с точки зрения их пищевой и биологической ценности [35]. Холестерин необходим для поддержания стабильности клеточной мембраны. Он также отвечает за целостность мембраны и ее устойчивость к температурным перепадам. Присутствие 22-Дегидрохолестерин обусловлено, по-видимому, некоторой спецификой питания фитопланктоном. Халиностерин является антиоксидантом и ингибитором ацетилхолинэстеразы и однозначно участвует в биохимических процессах в организме рассматриваемого моллюска [36]. Данное вещество, помимо всего прочего, оказывает противодиабетическое действие, как и γ -Ситостерин [37], а именно сильное ингибирующее действие на α -амилазу. Это может быть интересным в случае рассмотрения данного гидробионта с точки зрения его пищевой ценности. Природные стерин являются одними из основных соединений [38,39], фигурирующих биохимическом цикле исследуемого моллюска.

Таким образом, при исследовании липидов двустворчатого моллюска *P. aureus* в весенний сезон уровень ОЛ соответствовал $1,11 \pm 0,12 \text{ г} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$ сырого веса тканей. В распределении ОЛ обнаружена тканеспецифичность: накопление липидов в гепатопанкреасе превышало в 3 раза (ГП – $16,4 \pm 0,8 \text{ г} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$ сырого веса тканей), ткани ноги и жабр. Относительное содержание классов липидов во всех тканях было близким по значениям. В сумме всех тканей было обнаружено 23 ЖК и 5 стиролов. В составе ЖК обнаружено 11 – НЖК, с доминирующей 16:0 ($25,0 \pm 1,2$), 5 – МНЖК, с доминирующей 18:1ω-9-*cis* ($10,6 \pm 0,5$), 7 – ПНЖК, с доминирующей 20:5ω-3 ($12,0 \pm 0,6$). Среди стиролов, доминировал холестерин – $63,4 \pm 3,2\%$ от общего содержания ЖК и стерин.

Таблица 2. Состав стерина суммарной ткани моллюска *P. aureus*

Вещество	Время выхода, мин	Доля, % от общего содержания ЖК и стерина
22-Дегидрохолестерин	18,75	6,2±0,3
Холестерин	19,37	63,4±3,2
Брассикастерин	20,19	12,5±0,6
Халинастерин	21,28	9,9±0,5
γ-Ситостерин	23,44	8,0±0,4
Сумма:		100,0±5,0

ВЫВОДЫ (ЗАКЛЮЧЕНИЕ)

По результатам исследования липидов двустворчатого моллюска *P. aureus* в весенний сезон в прибрежной зоне на песочно-иловом грунте качественный и количественный состав ОЛ, ФЛ, МГ, ДГ и стиролов, ТАГ, а также их тканевая специфичность указывают на достаточный рацион питания и успешную адаптацию к прибрежным условиям (сгонно-нагонных явлений, перепадов температуры и т.п.). Об этом свидетельствует высокий уровень ОЛ в моллюске, а также высокое содержание МГ, ДГ+ст и наличие после холодного зимнего сезона достаточного количества ТАГ (запасных липидов). О богатой и разнообразной пище моллюска свидетельствует состав ЖК и стиролов. Наличие линолевой кислоты (18:2ω-6), незаменимой для человека, а также арахидоновой (20:4ω-6), эйкозапентаеновой (20:5ω-3) и докозагексаеновой (22:6ω-3), являющихся частично незаменимыми жирными кислотами, делает этот вид моллюсков привлекательным как в отношении развития марикультуры, так и в отношении пищевых и других биотехнологий.

Источник финансирования: Работа выполнена при поддержке Работа выполнена по теме 124030100137-6 государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН «Функциональные, метаболические и молекулярно-генетические механизмы адаптации морских организмов к условиям экстремальных экотопов Черного и Азовского морей и других акваторий Мирового океана.» Часть работы также выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ, проект № FEFM-2023-0005 (№ гос. регистрации 123021300156-4).

Список литературы / References:

- Есипенко Р.В. Научное обоснование и разработка технологии пищевых продуктов на основе биоконверсии двустворчатых моллюсков и молочной сыворотки. Дисс. канд. техн. наук. Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 2018 [Esipenko R.V. Scientific substantiation and development of food technology based on bioconversion of bivalve mollusks and whey. Cand. Sci. (Eng.) Diss. Far Eastern Federal University, Vladivostok, 2018 (In Russ.)].
- Tan K., Ma H., Li S., Zheng H. Bivalves as future source of sustainable natural omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 2019, vol. 311, p. 125907, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125907.
- Tan K., Huang L., Tan K., Lim L., Peng Y., Cheong K.L. Effects of culinary treatments on the lipid nutritional quality of fish and shellfish. *Food Chemistry: X*, 2023, vol. 19, p. 100856, DOI: 10.1016/j.fochx.2023.100856.
- Dean J.M., Lodhi I.J. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein & Cell*, 2018, vol. 9, no. 2, pp. 196-206, DOI: 10.1007/s13238-017-0423-5.
- Bakhmet I.N., Fokina N.N., Ruokolainen T.R. Changes of heart rate and lipid composition in *Mytilus edulis* and *Modiolus modiolus* caused by crude oil pollution and low salinity effects. *Journal of Xenobiotics*, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 46-60, DOI: 10.3390/jox11020004.
- Kraemer F.B., Khor V.K., Shen W.J., Azhar S. Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013, vol. 371, no. 1, pp. 15-19, DOI: 10.1016/j.mce.2012.10.012.
- Han X. Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 2016, vol. 12, no. 11, pp. 668-679, DOI: 10.1038/nrendo.2016.98.
- Nemova N.N., Meshcheryakova O.V., Lysenko L.A., Fokina N.N. The assessment of the fitness of aquatic organisms relying on the biochemical status. *Transactions of the Karelian Research Centre RAS*, 2014, vol. 5, pp. 18-29.
- Fokina N.N., Ruokolainen T.R., Nemova N.N., Martynova D.M., Sukhotin A.A. Fatty acids distribution in seston, tissues, and faecal pellets of blue mussels *Mytilus edulis* L. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2020, vol. 495, no. 1, pp. 311-318, DOI: 10.1134/S1607672920060046.
- Fokina N.N., Ruokolainen T.R., Bakhmet I.N., Nemova N.N. Role of lipids in adaptation of mussels *Mytilus edulis* L. of the White Sea to rapid changes in temperature. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2014, vol. 457, pp. 155-157, DOI: 10.1134/S1607672914040103.
- Rozentsvet O.A., Fedoseeva E.V., Terekhova V.A. Lipid biomarkers in ecological assessment of soil biota: analysis of fatty acids. *Biology Bulletin Reviews*, 2019, vol. 139, no. 2, pp. 161-177, DOI: 10.1134/S0042132419020078.
- Жукова Н.В. Жирные кислоты морских организмов: таксономические и трофические маркеры. Дисс. док. биол. наук. Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, 2009 [Zhukova N.V.

- Fatty acids of marine organisms: taxonomic and trophic markers*. Dr. Sci. (Biol.) Diss. Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 2009 (In Russ.).
13. Saito H. Unusual novel n-4 polyunsaturated fatty acids in cold-seep mussels (*Bathy modiolus japonicus* and *Bathymodiolus platifrons*), originating from symbiotic methanotrophic bacteria. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1200, no. 2, pp. 242-254, DOI: 10.1016/j.chroma.2008.05.094.
14. Barnathan G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie*, 2009, vol. 91, no. 6, pp. 671-678, DOI: 10.1016/j.biochi.2009.03.020.
15. Pazos A.J., Silva A., Vazquez V., Perez-Paralle M.L., Roman G., Sanchez J.L., Abad M. Sterol composition of gonad, muscle and digestive gland of *Pecten maximus* from Malaga (South Spain). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, vol. 134, no. 3, pp. 435-446, DOI: 10.1016/S1096-4959(02)00284-1.
16. Sundarraj S., Thangam R., Sreevani V., Kaveri K., Gunasekaran P., Achiraman S., Kannan S. γ -Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, vol. 141, no. 3, pp. 803-809, DOI: 10.1016/j.jep.2012.03.014.
17. Napolitano G.E., Ackman R.G., Silva-Serra M.A. Incorporation of dietary sterols by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) fed on microalgae. *Marine Biology*, 1993, vol. 117, pp. 647-654, DOI: 10.1007/BF00349777.
18. Perrat E., Couzinet-Mossion A., Fossi Tankoua O., Amiard-Triquet C., Wielgosz-Collin G. Variation of content of lipid classes, sterols and fatty acids in gonads and digestive glands of *Scrobicularia plana* in relation to environment pollution levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, vol. 90, pp. 112-120, doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.12.019.
19. Caracci E., Vega-Herrera A., Dachs J., Berrojalbiz N., Buonanno G., Abad E., Llorca M., Moreno T., Farre M. Micro(nano)plastics in the atmosphere of the Atlantic Ocean. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, vol. 450, p. 131036, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131036.
20. Orban E., Di Lena G., Navigato T., Casini I., Caproni R., Santaroni G., Giulini G. Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic Sea. *Food Chemistry*, 2007, vol. 101, no. 3, pp. 1063-1070, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.03.005.
21. Dalgic G., Ceylan Y. Seasonal discards and by-catch of striped venus clam (*Chamelea gallina*) (Mollusca, Bivalves) fishery in the Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2012, vol. 12, no. 4, pp. 811-816, doi: 10.4194/1303-2712-v12_4_09.
22. Mohammad Samya H., Yusuf Mohamed S. Proximate evaluation of some economical seafood as a human diet and as an alternative prospective valuable of fish meal. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 12-27, doi: 10.3923/jfas.2016.12.27.
23. Hashem K. Invasion dynamics of a non-indigenous bivalve clam *Venerupis aurea* (Gmelin, 1791), in Lake Qarun, Egypt. *Journal of Advances in Biology*, 2017, vol. 10, no. 2, pp. 2056-2060, doi: 10.24297/jab.v10i2.6248.
24. Costa R., Albergamo A., Piparo M., Zacccone G., Capillo G., Manganaro A., Dugo P., Mondello L. Multidimensional gas chromatographic techniques applied to the analysis of lipids from wild-caught and farmed marine species: comprehensive GC determination of fatty acids in fish and shellfish. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2016, vol. 119, no. 2, doi: 10.1002/ejlt.201600043.
25. *Промысловые биоресурсы Черного и Азовского морей*. Под ред. В.Н. Еремеева, А.В. Гаевской, Г.Е. Шульмана, Ю.А. Загородней. Севастополь, ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011, 367 с. [*Promyslovye bioresursy Chernogo i Azovskogo morey*. Pod red. V.N. Eremeeva, A.V. Gaevskoy, G.E. Shul'mana, Yu.A. Zagorodney. Sevastopol, EKOSHI-Gidrofizika, 2011, 367 p. (In Russ.)].
26. Borodina A.V., Zadorozhny P.A. Distinctive variations in carotenoid accumulation in tissues of the clam *Politapes aureus* (Gmelin, 1791) from the Black Sea. *Russian Journal of Marine Biology*, 2022, vol. 48, no. 5, pp. 393-397, doi: 10.1134/S1063074022050145.
27. Borodina A.V., Velyaev Yu.O., Osokin A.R. Comprehensive methodological approach to determining lipids in clams. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2023, vol. 53, no. 4, pp. 662-672, doi: 10.21603/2074-9414-2023-4-2464.
28. Веляев Ю.О., Бородин А.В., Пименов К.А., Осокин А.Р. Изучение различных методологических подходов к извлечению жирнокислотной фракции из сложной биологической матрицы и идентификация её состава с помощью хромато-масс-спектрометрии. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 2025, т. 25, № 1, с. 74-89 [Velyaev Yu.O., Borodina A.V., Pimenov K.A., Osokin A.R. Study of various methodological approaches for extraction of fatty acid fraction from complex biological matrix and identification of its composition using chromatography-mass spectrometry. *Sorption and Chromatographic Processes*, 2025, vol. 25, no. 1, pp. 74-89, doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/12796 (In Russ.)].
29. Бородин А.В., Пименов К.А., Веляев Ю.О., Осокин А.Р. Сезонная динамика липидов тканей двусторчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* псевдोलиторальной зоны. *Техника и технология пищевых производств*, 2024, т. 54, № 3, с. 558-570 [Borodina A.V., Pimenov K.A., Velyaev Yu.O., Osokin A.R. Seasonal dynamics of lipid tissue composition in the bivalve mollusk *Cerastoderma glaucum* from the pseudolittoral zone. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2024, vol. 54, no. 3, pp. 558-570, DOI: 10.21603/2074-9414-2024-3-2528 (In Russ.)].
30. *Черноморские моллюски: элементы сравнительной и экологической биохимии*. Под ред. Шульмана Г.Е., Солдатов А.А. Севастополь, ЭКОСИ-Гидрофизика, 2014, 323 с. [*Black Sea mollusks: elements of comparative and ecological biochemistry*. Ed. by Shulman G.E., Soldatov A.A. Sevastopol, EKOSI-Gidrofizika, 2014, 323 p. (In Russ.)].

31. Sokolova A.S., Mikryakov D.V., Mikryakov V.R. Age-related changes in malondialdehyde levels in tissues of the bivalve *Anodonta cygnea*. *Inland Water Biology*, 2020, vol. 13, no. 1, pp. 107-110, doi: 10.1134/S1995082920010149.
32. Banaszak M., Dobrzynska M., Kawka A., Gorna I., Wozniak D., Przyslawski J., Drzymala-Czyz S. Role of Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) as modulatory and anti-inflammatory agents in noncommunicable diet-related diseases - Reports from the last 10 years. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2024, vol. 63, pp. 240-258, doi: 10.1016/j.clnesp.2024.06.053.
33. Karageorgou D., Rova U., Christakopoulos P., Katapodis P., Matsakas L., Patel A. Benefits of supplementation with microbial omega-3 fatty acids on human health and the current market scenario for fish-free omega-3 fatty acid. *Trends in Food Science & Technology*, 2023, vol. 136, no. 4, DOI: 10.1016/j.tifs.2023.04.018.
34. Banaszak M., Dobrzynska M., Kawka A., Gorna I., Wozniak D., Przyslawski J., Drzymala-Czyz S. Role of Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) as modulatory and anti-inflammatory agents in noncommunicable diet-related diseases - Reports from the last 10 years. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2024, vol. 63, pp. 240-258, doi: 10.1016/j.clnesp.2024.06.053.
35. Schulze M.B., Minihaue A.M., Saleh R.N.M., Riserus U. Intake and metabolism of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: nutritional implications for cardiometabolic diseases. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2020, vol. 8, no. 11, pp. 915-930, doi: 10.1016/S2213-8587(20)30148-0.
36. Farag M.A., Gad M.Z. Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2022, vol. 20, no. 1, p. 48, DOI: 10.1186/s43141-022-00329-0.
37. Lu H., Wang Z., Cao B., Cong F., Wang X., Wei W. Dietary sources of branched-chain fatty acids and their biosynthesis, distribution, and nutritional properties. *Food Chemistry*, 2024, vol. 431, p. 137158, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.137158.
38. Fiorini R., Ventrella V., Trombetti F., Fabbri M., Pagliarani A., Nesci S. Lipid-protein interactions in mitochondrial membranes from bivalve mollusks: molecular strategies in different species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2019, vol. 227, pp. 12-20, doi: 10.1016/j.cbpb.2018.08.010.
39. Islam M.N., Choi S.H., Moon H.E., Park J.J., Jung H.A., Woo M.H., Woo H.C., Choi J.S. The inhibitory activities of the edible green alga *Capsosiphon fulvescens* on rat lens aldose reductase and advanced glycation end products formation. *European Journal of Nutrition*, 2014, vol. 53, no. 1, pp. 233-242, doi: 10.1007/s00394-013-0521-y.

FEATURES OF LIPID ACCUMULATION IN THE TISSUES OF THE BIVALVE MOLLUSK *POLITITAPES AUREUS* (GMELIN, 1791) IN THE SUBLITTORAL ZONE OF THE SEVASTOPOL COAST

Borodina A.V.¹, Pimenov K.A.¹, Velyaev Yu.O.²

¹A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nakhimova ave. 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: borodinaav@mail.ru

²Sevastopol State University
Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia
Received 19.07.2025

Abstract. This study is dedicated to the lipid accumulation characteristics of the little-studied bivalve species *Polititapes aureus*, widely distributed on sandy-silty substrates in the coastal, sublittoral zone of Sevastopol. The paper presents the results of the investigation of total lipids (TL), phospholipids (PL), mono- and diglycerides, and sterols (DG+St), free fatty acids, and triacylglycerols (TAG) in the tissues of the foot, gills, and hepatopancreas (HP), as well as the fatty acid composition (FA) of the total lipids in *P. aureus* tissues. The investigations were carried out during the spring period, when the mollusk's annual cycle begins. In the study of lipids in the *P. aureus* during spring, the level of total lipids corresponded to $1.11 \pm 0.12 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ of wet tissue weight. Tissue specificity was observed in the distribution of TL: lipid accumulation in the hepatopancreas exceeded that in the foot and gills by three times (HP – $16.4 \pm 0.8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ of wet tissue weight). The lipid class contents in all tissues were similar in values, yet some differences among the studied tissues could be highlighted: a low PL value ($19.5 \pm 3.6\%$) and the highest mono- and diglycerides value ($5.9 \pm 1.0\%$) in the foot of the clams, the highest DG+St value in the HP – $30.9 \pm 3.9\%$, as well as high TAG values in the foot and gills (17.5 ± 2.3 ; 17.2 ± 3.8 , respectively). A total of 23 FAs and 5 sterols were identified across all tissues. Among the FAs, 11 were saturated fatty acids, with the dominant being 16:0 (25.0 ± 1.3), 5 monounsaturated FAs, with the dominant being 18:1 ω -9-cis (10.6 ± 0.5), and 7 polyunsaturated FAs, with the dominant being 20:5 ω -3 (12.0 ± 0.6). Among the sterols, cholesterol dominated, comprising $63.4 \pm 3.2\%$ of the total sterols and FAs.

Key words: *Polititapes aureus*, lipids, fatty acids, sterols, Black Sea.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛАНКТОННОГО СООБЩЕСТВА КРЫМСКОГО ШЕЛЬФА В ПЕРИОД ПРОХОЖДЕНИЯ ТЕПЛОВЫХ ВОЛН

Пионтковский С.А.¹, Мельник А.В.², Климова Т.Н.², Георгиева Е.Ю.²

¹ Севастопольский государственный университет

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

² Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова 2, г. Севастополь 299011, РФ

Поступила в редакцию 09.06.2025

Аннотация. Морские тепловые волны представляют собой температурные аномалии, формирующиеся на границе взаимодействия океана и атмосферы. На масштабах многолетней изменчивости средиземноморский бассейн (включая Черное море) испытывает воздействие тепловых волн нарастающей частоты и мощности. Взаимодействуя с морской поверхностью, аномалии в атмосфере изменяют термическую и динамическую структуру биотопа планктонного сообщества, т.к. могут длиться от нескольких дней до нескольких недель. На основе материалов контактных (экспедиционных) измерений и дистанционного зондирования поверхности моря выполнен анализ характеристик пространственно-временной и таксономической структуры планктонного сообщества крымского шельфа в период прохождения тепловых волн в Средиземноморском бассейне в летние месяцы 2003, 2010 и 2023 годов. Показано, что тепловые волны усиливают температурную стратификацию биотопа планктонного сообщества, для которого характерен заглубленный максимум биомассы динофитовых водорослей и интенсивности биолюминесценции, периодически изменяющий свою структуру в связи с суточными вертикальными миграциями биолюминесцентофитов. В зоопланктоне максимальную вспышку численности после прохождения тепловой волны 2010 года формировали теплолюбивые виды. В ихтиопланктоне положительные температурные аномалии в поверхностном слое, не превышающие оптимальных температур для эмбрионального развития, способствуют раннему развитию икринок и личинок массовых пелагофильных видов рыб (прежде всего хамсы- *Engraulis encrasicolus*).

Ключевые слова: тепловые волны, биолюминесценция, фитопланктон, зоопланктон, Черное море.

ВВЕДЕНИЕ

Глобальное потепление атмосферы и океана сопровождается увеличением экстремальных значений характеризующих его параметров. Примером служат тепловые волны (heat waves), которые представляют собой температурные аномалии, модулируемые антициклонической атмосферной циркуляцией, приводящей к значительным положительным отклонениям от климатического тренда в средиземноморском бассейне. Аномалии летнего сезона могут иметь катастрофические последствия. Так, в тепловой волне, накрывшей Европу в июне 2003 года, отклонения температуры воздуха от средней составили 7,5 – 12,5°C, что привело, по разным оценкам, к 40-70 тысячам смертных случаев [1,2]. Тепловой волне предшествовал трехмесячный период почти штилевой погоды.

Экологическая значимость феномена усиливается тем, что тепловые волны развиваются на фоне глобального потепления, сильно выраженного в средиземноморском бассейне. Так, тепловая волна 2010 года была мощнее волны 2003 года [1]. В свою очередь, трехнедельная июльская волна 2023 года, с температурой около 35°C, установила рекорд зарегистрированный ранее.

Физические взаимодействия на границе океана и атмосферы транслируют атмосферные тепловые волны в морские, что, в конечном итоге, отражается на структуре и функционировании планктонных сообществ [3]. В самом определении тепловой волны существует спектр интерпретаций [4-6], в котором превышение сезонного тренда температуры поверхности моря (ТПМ) на величину его 95% доверительного интервала в течение 5 суток нам представляется достаточно адекватной формулировкой.

В Черном море тепловые волны менее интенсивны по сравнению с таковыми Средиземного моря, но их частота и модальность увеличиваются на фоне глобального и регионального трендов температуры [7].

В первых десятилетиях XXI века Российской Академией Наук было организовано около 30 экспедиций на научно-исследовательском судне «Профессор Водяницкий», направленных на комплексное изучение экосистемы крымского шельфа и дополненных многолетним мониторингом на прибрежных станциях. Некоторые из этих экспедиций охватили периоды прохождения тепловых волн в средиземноморском бассейне. Задача наших исследований состояла в выявлении характерного состояния пространственно-временной структуры планктонного сообщества в эти периоды. Такой анализ представляет интерес для совершенствования моделей пространственно-временной структуры пелагической экосистемы крымского шельфа с учетом экстремальных природных ситуаций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалы экспедиционных исследований, охватывающие эпизоды прохождения тепловых волн в средиземноморском бассейне (например, в июле-августе 2003, 2010 и 2023 годов) содержат набор биологических измерений, представленный результатами обработки собранных проб фитопланктона, зоопланктона, ихтиопланктона и интенсивности биолюминесценции планктонного сообщества, которую формируют организмы фито и зоопланктона. Фоновыми измерениями при этом выступают вертикальные зондирования водной толщи погружными комплексами *SBE-911 plus*, *IDRONAUT OCEAN SEVEN 320*, и «Сальпа-М», характеризующие термохалинную структуру и оптические свойства верхних слоев (прежде всего, фотосинтетическую активную радиацию и флуоресценцию хлорофилла *a*). При пересчете интенсивности флуоресценции в концентрацию хлорофилла *a*, используется прямо пропорциональная зависимость [8].

Пробы фитопланктона объемом 2 литра отбирали кассетным батометром зондирующего комплекса. Горизонты отбора проб выбирали с учетом вертикального распределения температуры. Пробы сгущали методом обратной фильтрации через трековые мембранные фильтры с диаметром пор 1 мкм. Полученный концентрат (40–50 мл) фиксировали раствором Люголя и хранили в холодильнике. Видовой состав и размеры клеток фитопланктона оценивали под световым микроскопом XY-82, используя камеру Наумана, после чего рассчитывали объем и биомассу клеток.

При оценках интенсивности биолюминесценции измеряемым параметром был биолюминесцентный потенциал планктонного сообщества (БП), который характеризует максимальную энергию высвечивания ($\text{Вт} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{л}^{-1}$) всех организмов, попавших в измерительную камеру прибора:

$$\text{БП} = \int B(t) dt, \quad (1)$$

где $B(t)$ – интенсивность эмиссии света во время вспышки (t).

Для вертикальных зондирований использовали приборный комплекс «Сальпа-М», измеряющий механически стимулированную (погружающимся прибором) биолюминесценцию в диапазоне 10^{-13} – 10^{-8} $\text{Вт} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{л}^{-1}$, с точностью $\pm 10\%$, гидростатическое давление, температуру, электропроводность, мутность, флуоресценцию хлорофилла и фотосинтетически активную радиацию. Дискретность измерений при погружении прибора со скоростью $1,2 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, составляла 0,25 метра. Более детально методика измерений БП была описана ранее [9].

Пробы зоопланктона, собранные планктонной сетью Джели с диаметром входного кольца 36 см и размером ячеей 140–150 мкм, сгущенные до 100 мл, фиксировали нейтральным раствором формалина до 4%-й концентрации в пробе. Далее их обрабатывали счетно-порционным методом в камере Богорова, с определением количества организмов, их размера и таксономического состава.

Пробы ихтиопланктона, собирали сетью ИКС-80 с размером ячеей сетного конуса 400 мкм в режиме вертикальных ловов. На глубоководных станциях облавливали слой от нижней границы кислородного слоя ($\sigma_t = 16,2$ усл.ед. по данным CTD зондов *SBE 911 plus* и *Indronaut Os320 Plus*) до поверхности, а на мелководных станциях – слой от дна до поверхности. Материал фиксировали 4% раствором формалина и обрабатывали в стационарных условиях под микроскопом МБС-10.

Помимо прямых контактных измерений были использованы данные дистанционных измерений температуры поверхностного слоя и фотосинтетически активной радиации радиометром спутника «MODIS-Aqua/Terra» с месячным осреднением и пространственным разрешением 9 км.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Временная серия среднемесячной температуры поверхности моря (ТПМ) характеризуют многолетнюю и сезонную динамику, включая эпизоды прохождения тепловых волн (рис. 1). Поле крупномасштабного тренда аномалий ТПМ в масштабе средиземноморского бассейна приведено только для 2023 года, как одного из самых теплых. Оно показывает, что по интенсивности прогрева верхнего слоя, воды северной части Черного моря были ему подвержены в значительной мере, т.к. по предложенной классификации попадали в третью экстремальную категорию (по возрастанию) из четырех возможных.

Согласно среднемесячной временной серии дистанционных измерений осредненных для шельфа Крыма, ТПМ в августе 2023 года достигла $25,8^\circ\text{C}$, а в августе следующего года – уже $26,1^\circ\text{C}$. Однако, абсолютный максимум тепловой волны все же приходился на июль 2010 года, когда осредненная температура на шельфе составляла $27,6^\circ\text{C}$. Вся временная серия представлена в виде отклонений среднемесячной температуры от многолетней средней для 2002–2024 годов (рис. 1).

Термохалинная структура биотопа играет важную роль в формировании пространственно-временной структуры численности и биомассы планктонного сообщества. При этом температура доминирует в формировании термохалинной стратификации вод на шельфе Крыма. В летний период ее вклад в 5 раз превосходит таковой солености в поверхностном слое и более чем на порядок – в слое сезонного термоклина [11].

В экологическом аспекте прохождение тепловой волны (т.е. воздействие высокой температуры)

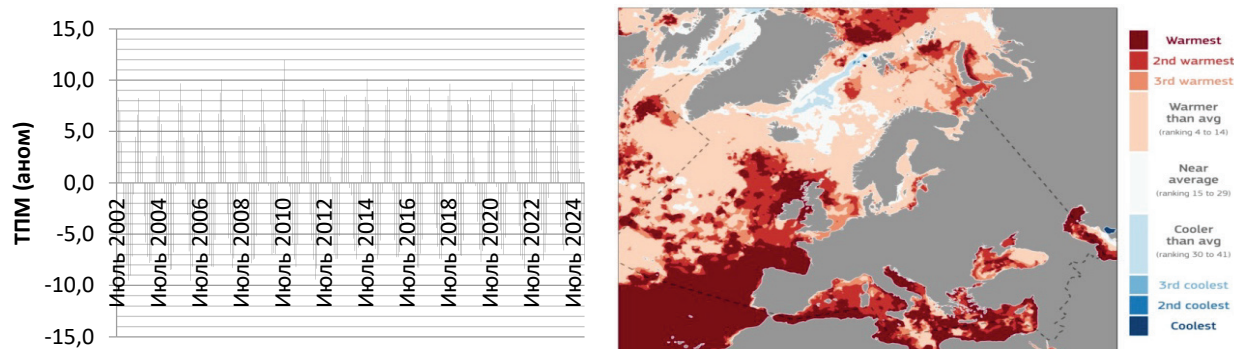


Рисунок 1. Пространственно-временные характеристики ТПМ в водах крымского шельфа и средиземноморского бассейна. Слева: отклонения среднемесячных ТПМ (°C) в 2003-2025 годах пространственно осредненные для крымского шельфа по данным дистанционного зондирования (MODIS-Aqua). Справа: карта средиземноморского бассейна с ранжированными ТПМ 2023 года, относительно многолетней средней 1980-2023 годов [10]

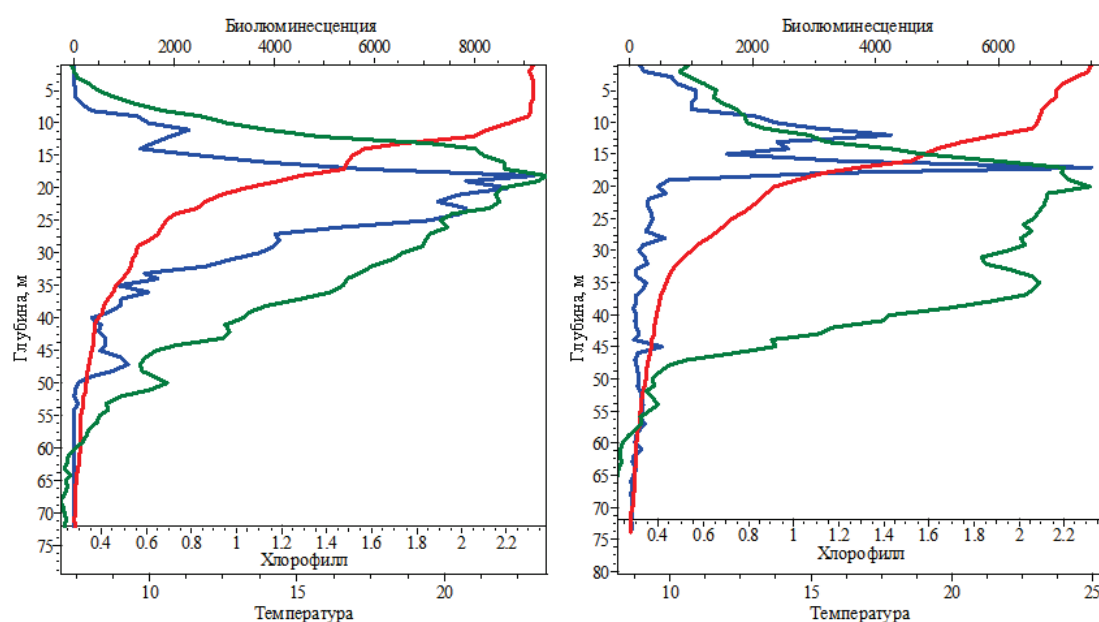


Рисунок 2. Распределение интенсивности биолюминесценции (кривая синего цвета), температуры (красный цвет) и концентрации хлорофилла-а (зеленый цвет) при прохождении тепловых волн. Слева: 64-й рейс НИС «Профессор Водяницкий», август 2010 года. Справа: 128-й рейс НИС «Профессор Водяницкий», август 2023 года. Зондирования выполнены в ночное время

длительностью от нескольких дней до недель влияет на популяции планктона как непосредственно, так и опосредованно. В первом случае увеличивается репродуктивный и генеративный рост. Во втором максимально обостряется вертикальный градиент температуры, солености, плотности, и скорости течений, изменяя тем самым пространственное распределение численности и биомассы организмов.

Одним из важных параметров пространственно-временной структуры планктонного сообщества является интенсивность его биолюминесценции. Вертикальное распределение биолюминесцентного потенциала на шельфе южного берега Крыма при прохождении тепловых волн 2010 и 2023 годов характеризовалось заглубленным максимумом на глубине ~20 м, под слоем сезонного термоклина, в ночное время (рис. 2). При этом очевиден прогрев верхних слоев, формирующий квазиоднородный слой толщиной 8-10 м. Заглубленный максимум биолюминесцентного потенциала периодически изменял свою структуру в связи с суточными вертикальными миграциями светящейся фракции организмов планктона. Совокупность летних зондирований показала, что толщина слоя биолюминесцентного максимума и его интенсивность варьировали вдоль шельфа, в среднем увеличиваясь в западном направлении, что соответствовало увеличению площади шельфа и величин первичной продукции в верхнем слое.

Биолюминесцентный потенциал планктона формируется его фито и зоопланктонной фракциями. В поверхностном слое, в июле 2010 и 2019 годов (рис. 3), доминировала крупноклеточная диатомовая водоросль *Pseudosolenia calcar-avis* (Schultze) B.G.Sundström, 1986, формировавшая биомассу более $100 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-3}$, что составляло более 70% суммарной биомассы фитопланктона. Начиная с глубин 10-15 метров, вклад этой

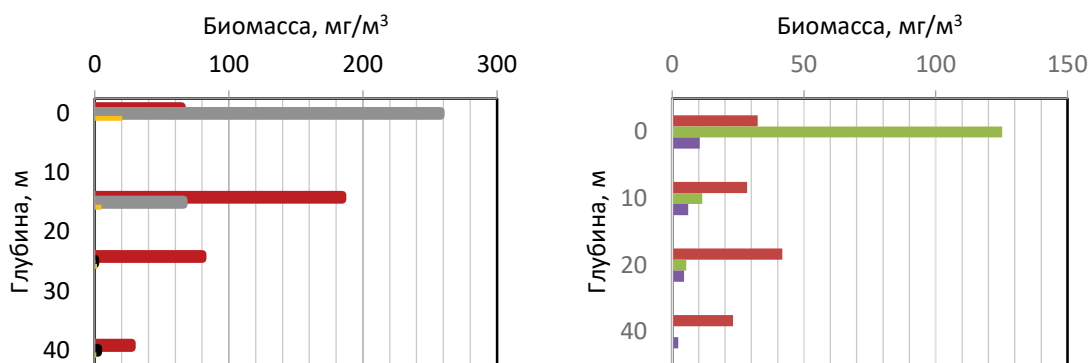


Рисунок 3. Вертикальное распределение биомассы трех основных таксономических групп фитопланктона. Слева: 64-й рейс, НИС «Профессор Водяницкий», июль 2010 года. Справа: 108-й рейс, июль 2019 года. *Dinophyceae*, *Bacillariophyceae*, и *Prymnesiophyceae* даны красным, зеленым и фиолетовым цветами (соответственно)

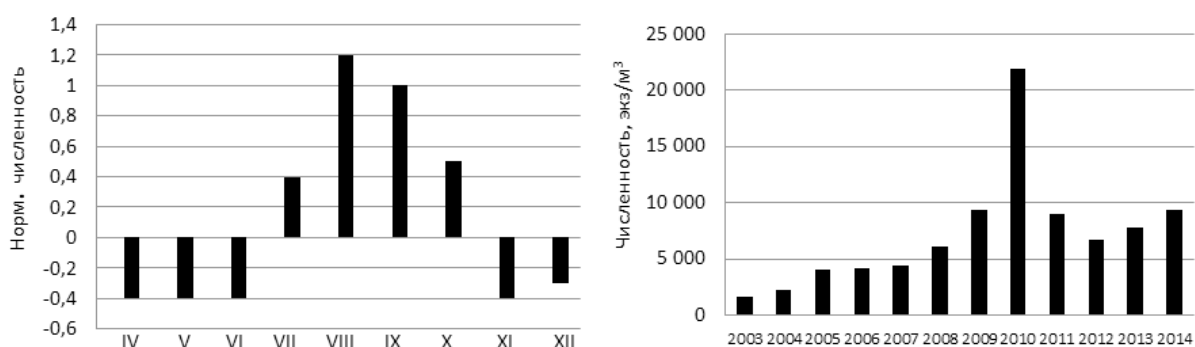


Рисунок 4. Среднемесячная нормированная численность *P. avirostris* в 2010 году и многолетняя изменчивость численности в прибрежных водах г. Севастополя ([12], с изменениями)

водоросли в суммарную биомассу значительно снижался (составляя не более 25%), и увеличивалась доля динофитовых: *Tripes furca* (Ehrenberg) F.Gómez, 2013 (30%), *Dinophysis caudata* Saville-Kent, 1881 (13%), *Protoperidinium steinii* (Jørgensen, 1899) Balech, 1974 (12%), и *Protoperidinium divergens* (Ehrenberg) Balech, 1974 (10%). С горизонта отбора проб -20 метров встречались единичные экземпляры *P. calcar-avis*, а в суммарной биомассе доминировали динофитовые водоросли: *T. furca* (48%), *Scrippsiella acuminata* (Ehrenberg) Kretschmann, Elbrächter, Zinssmeister, S. Soehner, Kirsch, Kusber & Gottschling, 2015 (22%), *Kryptoperidinium triquetrum* (Ehrenberg) U. Tillmann, M. Gottschling, M. Elbrächter, W.-H. Kusber & M. Hoppenrath, 2019 (17%), *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) F. Stein, 1878 (16%), и *Tripes muelleri* Bory de Saint-Vincent, 1826 (14%).

Материалы по сбору проб зоопланктона позволили анализировать временную изменчивость лишь в широких (осредненных тотальными ловами) слоях. Ежемесячные обловы верхнего 50-метрового слоя в 2002-2004 годах захватили эпизод прохождения тепловой волны в средиземноморском бассейне в июле-августе 2003 года [3]. Она была хорошо выражена в атмосферных температурных аномалиях над Европой, в динамике зоопланктона в Средиземном море, но не прослеживалась в прибрежье Крыма. Наибольший вклад в формирование суммарной численности зоопланктона вносили Copepoda (*Oithona davisae* Ferrari F.D. & Orsi, 1984, *Acartia clausi* Giesbrecht, 1889, *Acartia tonsa* Dana 1849) и Cladocera (*Penilia avirostris* Dana 1849). Динамика численности *P. avirostris* заслуживает особого внимания, т.к. этот теплолюбивый вид достигает высокой численности только летом и осенью, исчезая из сезонного цикла численности зоопланктона при низких зимних температурах. В 2003 году среднегодовая численность *P. avirostris* была сравнительно низкой (238 ± 117 экз m^{-3}), и заметного отклика численности на прохождение тепловой волны не наблюдалось.

Семью годами позже среднегодовая численность *P. avirostris* в 5 раз превышала таковую 2003 года и составляла 1164 ± 597 экз m^{-3} [12]. При прохождении тепловой волны 2010 года численность в августе заметно увеличилась по сравнению с таковой в предыдущие и последующие месяцы (рис. 4). Максимум температуры поверхности моря в августе 2010 года по данным контактных измерений на прибрежной станции составлял $28,2^{\circ}C$ при аномалии $2,74^{\circ}C$. В целом, среднегодовая суммарная численность 9 основных видов рачкового зоопланктона на порядок превышала таковую 2003 года и была максимальной за период 2003-2014 годов (рис. 4). По данным авторов наибольший вклад в ее формирование в 2010 году вносили *O. davisae*, *O. similis*, *Paracalanus parvus*, и *P. avirostris*.

Оптимальная температура воды для размножения большинства видов тепловодных пелагофильных рыб ограничивается $24-25^{\circ}C$. Хамса *Engraulis encrasicolus* Linnaeus, 1758 имеет пределы оптимальной температуры -

около 26°C с незначительными отклонениями [13]. В июле и августе 2010 года видовой состав ихтиопланктона в водах шельфа был представлен всего четырьмя теплолюбивыми видами рыб. В июле доминировала хамса, доля икры которой составляла 96%, а личинок 69%. В августе, с повышением температуры поверхности моря до 28°C, численность икры хамсы по сравнению с июлем, сократилась в 3,5 раза, а ее личинки в пробах уже отсутствовали. В августе 2023 г., средняя температура поверхности моря составляла 26,4°C. В ихтиопланктоне идентифицирован 21 вид. Количество видов в шельфовой и глубоководной зонах оказалось одинаковым [14]. Хамса доминировала на всей акватории моря от узко-прибрежной до глубоководной зон. Доля ее икры в среднем составляла 87%, а личинок - 87%. Остальные виды встречались единично. Все личинки хамсы были на желточном типе питания, а размерный состав (TL 2.4) суточных личинок хамсы был в 1,5 раза ниже, чем в 1970-х годах (TL 3,5 мм) и соответствовал размеру предличинок при выклеве [15].

Отсутствие многолетних мониторинговых исследований ихтиопланктона не позволяет сформировать временные серии многолетнего масштаба (по дискретности измерений повторяющие таковые температуры поверхности моря). Можно отметить, что штилевая погода и резкое увеличение температуры окружающей среды, не превышающее оптимальные пределы в период эмбрионального и постэмбрионального развития пелагофильных видов рыб, приводят к сокращению временных периодов стадий развития и снижению размерно-массового состава личинок рыб. Дальнейшее выживание личинок определяет состояние кормовой базы (в основном, численность ювенальных стадий копепод). Повышение температуры выше оптимальных пределов для нереста и эмбрионального развития, снижает интенсивность нереста, вплоть до его прекращения, и вызывает гибель икры. Однако, благодаря многопорционному икрометанию большинство пелагофильных рыб возобновляет нерест после прохождения тепловых волн, с наступлением благоприятных температурных условий в период пролонгирования летнего гидрологического сезона на осеннее межсезонье [16]. Повышение динамической активности вод в прибрежно-шельфовой зоне в летний гидрологический сезон способствует расширению пространственного распределения икры и личинок рыб на сопредельные акватории моря.

В целом, прохождение тепловых волн усиливает вертикальную термическую и плотностную стратификацию биотопа планктонного сообщества и вертикальные градиенты численности и биомассы его структурных групп. Наши расчеты показывают, что соотношение масштаба пространства по вертикали и горизонтали, на котором наблюдается изменение биомассы зоопланктона и интенсивности биолюминесценции на один порядок, приблизительно равно 100. Эта величина указывает на экологическую значимость вертикальной составляющей пространственных градиентов пелагического сообщества, в формировании которых периодически участвуют и тепловые волны. Их частота и мощность нарастают глобально [14,17].

Что же касается временных масштабов больших чем периоды тепловых волн, то анализ ключевых параметров планктонного сообщества крымского шельфа (концентрации хлорофилла *a*, первичной продукции, интенсивности биолюминесценции и биомассы кормового зоопланктона над шельфом) не выявил статистически значимых трендов их межгодовой изменчивости в летний период 2010-2020 годов. Характерными для этих параметров оказались не столько монотонные (положительные или отрицательные) тренды, сколько межгодовые колебания [18]. Управляющие ими природные факторы рассмотрены в других работах [6,7].

ВЫВОДЫ

Таким образом, прохождение тепловых волн усиливает температурную стратификацию биотопа планктонного сообщества и способствует формированию максимальных вертикальных градиентов численности и биомассы фитопланктонной, зоопланктонной фракций и интенсивности биолюминесценции планктона. Заглубленный максимум биолюминесценции (под сезонным термоклином) периодически изменяет свою структуру в связи с суточными вертикальными миграциями биолюминесцентных организмов. В зоопланктоне увеличение численности после прохождения тепловой волны 2010 года обнаруживали преимущественно теплолюбивые виды (*Penilia avirostris*, *Oithona davisae* и др.). В ихтиопланктоне существование максимальных температурных положительных аномалий в верхнем слое моря, не превышающие оптимальных температур для эмбрионального развития, благоприятствует раннему развитию икринок и личинок массовых пелагофильных видов рыб (прежде всего хамсы - *Engraulis encrasicolus*).

Благодарности. работа выполнена в рамках государственных заданий СевГУ № FEFM-2024-0013 и ИнБЮМ № 124030400057-4 и 124022400148-4-0556-2024-00. Экспедиционные исследования обеспечивались Центром коллективного пользования НИС «Профессор Водяницкий» ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН.

Список литературы / References:

1. Barriopedro D., Fischer E.M., Luterbacher J. et al. The hot summer of 2010: temperature redrawing the temperature record map of Europe. *Science*, 2011, vol. 332.
2. Garcia Herrera R., Diaz J., Trico R.M. et al. A review of the european summer heat wave of 2003. *Critical Reviews in environment Science and Technology*, 2010, vol. 40.
3. Piontkovski S.A., Fonda-Umani S., Olita A. et al. The 2003 heat wave and marine plankton communities. *ICES Cooperative Research Report*, 2010, no. 300.

4. Capotondi A., Rodrigues R.R., Gupta A.S., et al. A global overview of marine heatwaves in a changing climate. *Communications Earth and Environment*, 2024, vol. 5, no. 701.
5. Hobday A.J., Alexander L.V., Perkins S.E. et al. A hierarchical approach to defining marine heatwaves. *Progress in Oceanography*, 2016, vol. 141.
6. Smale D.A., Wernberg T., Oliver E.C.J. et al. Marine heatwaves threaten global biodiversity and the provision of ecosystem services. *Nature Climate Change*, 2019, no. 9.
7. Mohamed B., Ibrahim O., Nagy H. Sea Surface Temperature Variability and Marine Heatwaves in the Black Sea. *Remote Sensing*, 2022, vol. 14, no. 2383.
8. Schmechtig C., Poteau A., Claustre H. et al. *Processing bio-Argo chlorophyll-A concentration at the DAC level*. Version 1.0. 30, 2015.
9. Melnik A., Melnik L., Mashukova O. et al. Field studies of bioluminescence in the Antarctic sector of the Atlantic Ocean in 2002 and 2020. *Luminescence*, 2021, vol. 36, no. 8.
10. Copernicus Programme. *Climate Change Service*. European Commission.
11. Belokopytov V.N. Seasonal variability of vertical thermohaline stratification of the Black Sea shelf of Crimea. *Ecological safety of Coastal and Shelf Zones of Sea*, 2019, iss.3.
12. Gubanova A., Gubanova K., Krivenko O. et al. Response of the Black Sea zooplankton to the Marine Heat Wave 2010: case of the Sevastopol Bay. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2022, vol. 10, no. 1933.
13. Dehnik T.V. *Ichthyoplankton of the Black Sea*. Kiev. Naukova Dumka, 1973.
14. Oliver E.C.J., Donat M.G., Burrows M.T. et al. Longer and more frequent marine heatwaves over the past century. *Nature Communications*, 2018, vol. 9, no. 1324.
15. Klimova T.N., Podrezova P.S., Subbotin A.A., Vdodovich I.V., Georgieva E.Yu. Ichthyoplankton of the Black Sea at the Beginning of the Summer Spawning Season 2018. *Water Resources*, 2022, vol.49, iss. 3.
16. Klimova T.N., Anninsky B.E., Subbotin A.A., Vdodovich I.V., Podrezova P.S. State of the ichthyo-, meso-, and macroplankton complexes off the Crimean Peninsula (the Black Sea) in connection with the hydrobiological regime features in October 2016. *Marine Biological Journal*, 2023, vol. 8, no. 2.
17. Collins M., Sutherland M., Bouwer L. et al. Extremes, abrupt changes and managing risk. *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate*, 2019.
18. Piontkovski S.A., Zagorodnyaya Yu.A., Serikova I.M. et al. Interannual variability of physical and biological characteristics of Crimean shelf waters in summer season (2010-2020). *Ecological safety of Coastal and Shelf Zones of Sea*, 2024, no. 2.

CHARACTERISTICS OF THE CRIMEAN SHELF PLANKTON COMMUNITY DURING A PERIOD OF HEAT WAVE PROPAGATION

Piontkovski S.A.¹, Melnik A.V.², Klimova T.N.², Georgieva E.Yu.²

¹ Sevastopol State University

University str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: spiontkovski@mail.ru

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

Nakhimov ave., Sevastopol, 299011, Russia

Received 09.06.2025

Abstract. Marine heat waves are thermal anomalies formed at the interface between the ocean and the atmosphere. On the scale of long-term variability, the Mediterranean basin (including the Black Sea) is affected by heat waves of increasing frequency and power. Interacting with the sea surface, these atmospheric anomalies change the thermal and dynamic structure of the plankton community habitat, as they can last from several days to several weeks. Based on the materials of expeditionary research and remote sensing, an analysis of the characteristics of the spatio-temporal and taxonomic structure of the Crimean shelf plankton community during the propagation of heat waves in the summer months of 2003, 2010 and 2023 was performed. It is shown that the propagation of a heat wave sharpens thermal stratification of the habitat, which is characterized by a deep maximum of dinoflagellate biomass and bioluminescence intensity. The later changes its structure due to diel vertical migrations of bioluminescents. In zooplankton, the maximal abundance after the passage of a heat wave is formed by thermophilic species. In ichthyoplankton, positive thermal anomalies of the surface layer, which do not exceed optimal temperatures for embryonic development, favor the early development of larvae and eggs of common pelagophilic fish species (primarily anchovy - *Engraulis encrasicolus*).

Key words: heat waves, bioluminescence, phytoplankton, zooplankton, Black Sea.

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ЭКОСИСТЕМЫ ЧЁРНОГО МОРЯ НА ОСНОВЕ АГЕНТНО-ОРИЕНТИРОВАННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Барановский А.А.¹, Кузнецов А.В.^{1,2}

¹ Севастопольский государственный университет

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

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

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

Поступила в редакцию 12.07.2025

Аннотация. Представлен комплексный анализ динамики экосистемы Чёрного моря на основе агентно-ориентированного моделирования с использованием методов временного анализа, включая коэффициент Хёрста. В рамках моделирования применена экологическая модель на языке Python с элементами стохастики, позволяющая исследовать динамику ключевых компонентов системы: растворимое органическое вещество (РОВ), бактерии, фитопланктон, зоопланктон, планктофаги, хищные рыбы и медузы. Результаты показывают формирование устойчивых пространственно-временных паттернов, аналогичных природным, и выявляют иерархию компонентов, где базовые биохимические процессы (РОВ и бактерии) демонстрируют наибольшую устойчивость, а фитопланктон – максимальную чувствительность к возмущениям. Высокие значения коэффициента Хёрста ($> 0,96$) свидетельствуют о сильной персистентности системы, что подтверждается статистическими критериями. Полученные данные позволяют сделать вывод о высокой стабильности экосистемы Чёрного моря и её чувствительности к изменениям в уровнях первичных продуцентов, что важно для мониторинга и сохранения морского биоразнообразия. Работа расширяет методы оценки устойчивости морских экосистем и демонстрирует возможность использования агентных моделей и анализа долгосрочной памяти для изучения динамики сложных экологических систем.

Ключевые слова: агентное моделирование, динамика систем, коэффициент Хёрста, Чёрное море, морская экология, временной анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Сложные экологические системы способны резко изменяться без внешних воздействий благодаря внутренней динамике [1]. Экосистема морской пелагиали – пример такой системы с нелинейными взаимодействиями между компонентами [2]. Чёрное море, как полузамкнутый бассейн с уникальными гидрологическими условиями, представляет интерес для моделирования эмерджентных свойств морских экосистем в слое воды 150–200 м над сероводородной зоной, напоминающей гигантскую чашку Петри [3]. В настоящей работе представлен результат компьютерного моделирования экосистемы Чёрного моря с акцентом на анализ её динамики, основанный на коэффициенте Хёрста [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Агентно-ориентированное моделирование. Модель реализована на Python 3.8 с использованием библиотеки Pygame 2.5. Варианты пространственной размерности варьируются от **1D** до **4D**, при этом в основном использовался двумерный вариант с размером области 800×800 пикселей. Агенты представляют семь компонентов: растворимое органическое вещество (РОВ) [5], бактерии, фитопланктон, зоопланктон, планктофаги, хищные рыбы и медузы. Размеры агентов от 2 пикселей (РОВ) до 8-9 пикселей (рыбы, медузы). Каждый агент обладает характеристиками – временем жизни, энергией, шансом на репродукцию, сенсорами для поиска жертвы и т.д. В модели применяются стохастические элементы, учитывающие случайные вариации в освещении, движении, размножении и смертности.

Каждый организм обладал характерным временем жизни и имел определённый шанс на репродукцию в течение жизненного цикла. Рыбы проходили стадию икры и взрослых особей. Икра оставалась неподвижной, в то время как взрослые рыбы маневрировали. Изначально каждому организму присваивалось исходное значение энергии, пропорциональное размеру. Энергия тратилась в результате движения организмов и охоты. Агенты обладали соответствующими сенсорами, позволяющими им обнаруживать добычу и преследовать её. В случае достижения количеством агентов минимального числа 1, они случайно мигрировали в иную область пространства.

Взаимодействия между агентами определялись матрицей хищник-жертва: РОВ утилизировались бактериями. Фито- и зоопланктон питался бактериями, причём фитопланктон получал дополнительную энергию света, а зоопланктон поглощал фитопланктон. Планктофаги питались планктоном. Хищные рыбы охотились на планктофагов и медуз. При этом медузы поедали как планктон, так и неподвижную икру рыб. В результате естественной смерти организмы распадались на пиксели и превращались в РОВ, замыкая тем самым открытый цикл углерода.

Динамика агентов. На каждом шаге симуляции (всего 5000 шагов) агенты обновляли своё состояние по следующим правилам: 1) движение в случайном направлении или целенаправленное перемещение к добыче в пределах радиуса чувствительности сенсоров; 2) питание при контакте с жертвой (поглощение энергии); 3) размножение при достижении порога энергии ($>80\%$ от максимальной) с определённой вероятностью; 4) старение (потеря энергии) и смерть при истощении энергии или достижении максимального возраста.

Анализ динамики. Для оценки долговременной памяти или самоподобия временных рядов использовался R/S-анализ с расчётом коэффициента Хёрста (H):

$$H = \log\left(\frac{R}{S}\right) / \log(n) \quad (1)$$

где R – размах накопленных отклонений, S – стандартное отклонение, n – длина временного ряда [6].

Коэффициент Хёрста интерпретировался следующим образом: $H \approx 0,5$ – случайный процесс (броуновское движение), $0,5 < H < 1$ – персистентный (устойчивый) процесс с долговременной памятью, $H \approx 1$ – детерминированный процесс с сильной персистентностью.

Статистический анализ. Для сравнения динамики компонентов применялись ANOVA с пост-хок тестом Тьюки [7], кроме того, рассчитывались кросс-корреляции между компонентами системы. Всё имплементировано на языке R 3.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пространственно-временная динамика. Модель продемонстрировала формирование устойчивых кластеров, аналогичных наблюдаемым в природных экосистемах (рис. 1). Например, представлены скопления **фитопланктона** в зонах повышенной освещённости (имитирующих верхние слои воды) уже через 100-300 шагов симуляции. Эти "цветения" формировали первичные центры биологической активности (рис. 2). Наблюдалась **самоорганизация трофических цепочек** вокруг скоплений фитопланктона – зоопланктон концентрировался вблизи фитопланктонных кластеров, привлекая планктофагов, которые в свою очередь привлекали хищных рыб. Отмечена квазипериодическая **динамика численности** (рис. 3), отражающая классические "волны жизни". Пик численности фитопланктона сменялся пиком зоопланктона, затем размножением планктофагов и хищных рыб. Также наблюдались **сукцессионные изменения** после примерно 1000 шагов, где первоначальное доминирование фитопланктона сменялось доминированием зоопланктона, а затем планктофагов. Присутствие желетелых (начальная численность 10 особей) иногда вело к критическому сокращению популяции планктофагов и хищных рыб, что соответствует инвазии гребневика *Mnemiopsis leidyi* в Чёрное море [8].

Размерность арены. Повышение размерности симуляции от **1D** к **4D** не приводило к существенным изменениям характера поведения системы, но очень замедляло моделирование в силу того, что вероятность случайной встречи пары агентов кардинально уменьшалась с увеличением размерности пространства, что вело к чрезвычайной гибели агентов от истощения и старости. Однако различия между **2D** и **3D** версиями было незначительным, что позволило нам подробно исследовать упрощённый **2D** вариант мульти-агентной системы.

Корреляция между компонентами. Корреляционная матрица для модельной экосистемы Чёрного моря показывает сложную структуру взаимосвязей между её компонентами (приложение 1). РОВ демонстрирует положительную корреляцию с фитопланктоном (0,66) и зоопланктоном (0,44), что отражает его роль в пищевых цепочках. РОВ также положительно связано с хищными рыбами (0,31), что соответствует трофическим связям. Интересно, что бактерии показывают отрицательную корреляцию с РОВ (-0,9), что объясняется их функцией по разложению РОВ. Медузы демонстрируют слабые отрицательные корреляции с большинством компонентов, что может быть связано с их альтернативными трофическими путями.

Анализ динамики компонентов. Увеличение числа шагов имитационного моделирования вело к уточнению показателей Хёрста. Рассчитанные по 10 независимым выполнениям программы длительностью по 5000 шагов коэффициенты Хёрста имели следующие значения: для РОВ – $0,998 \pm 0,010$, бактерий – $0,946 \pm 0,021$, фитопланктона – $0,875 \pm 0,009$, зоопланктона – $0,902 \pm 0,021$, планктофагов – $0,882 \pm 0,014$, хищных рыб – $0,925 \pm 0,013$ и медуз – $0,899 \pm 0,015$. Статистический анализ ANOVA для симуляций в 1000 шагов выявил значимые различия между компонентами ($F(6,63) = 14,05$, $p < 0,001$). Пост-хок тест Тьюки позволил выделить три статистически значимые группы (а, б, с), демонстрирующие иерархию стабильности: РОВ $\approx$ хищные рыбы $\approx$ бактерии $\approx$ медузы $>$ зоопланктон $>$ планктофаги $>$ фитопланктон (рис. 4).

Стабильное накопление РОВ (серые линии) в системе наглядно представлено на рисунке 3, также достаточно стабильно изменение количества бактерий (чёрные линии) и неожиданно стабилен в наших условиях размер популяции хищных рыб (малиновые линии), что указывает на возможность существования подобных динамических режимов в реальных условиях. Выявленные паттерны соответствуют наблюдаемым в природе процессам (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение с полевыми исследованиями

Паттерн модели	Реальный аналог	Источник
кластеризация фитопланктона	цветение фитопланктона	[9]
высокая устойчивость желетелых	экспансия гребневика мнемииопсиса <i>Mnemiopsis leidyi</i>	[10,11]
волны численности	3-4-летние циклы европейского анчоуса (хамсы) <i>Engraulis encrasicolus</i>	[12]
устойчивость бактерий	стабильность микробной петли	[13]

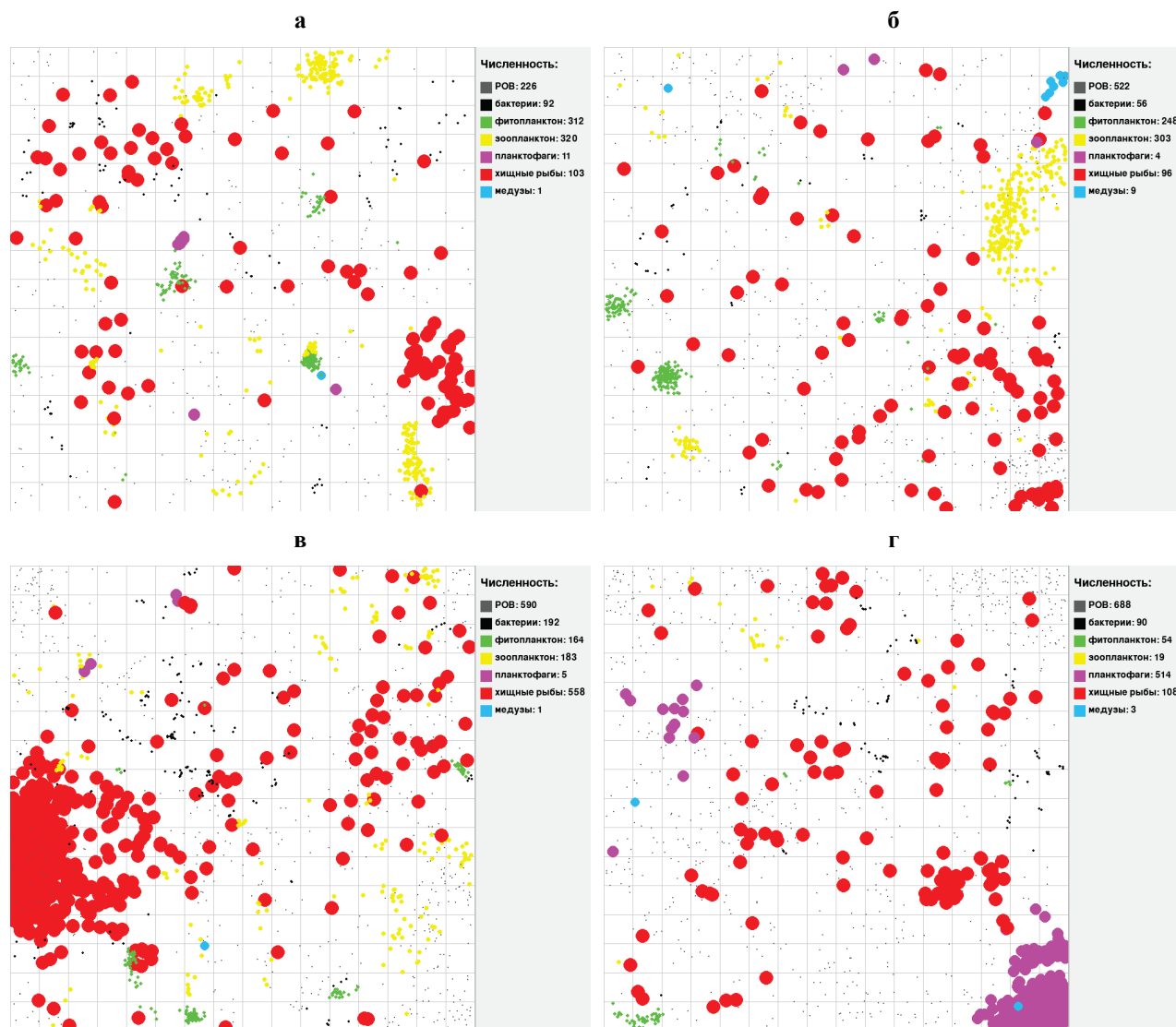


Рисунок 1. Пространственное распределение агентов на различных этапах симуляции:

- а) 500 (50) шагов – начальная кластеризация;
 б) 1000 (100) шагов – формирование трофических цепочек;
 в) 2500 (250) шагов – сукцессионные изменения;
 г) 5000 (500) шагов – квазистабильное состояние

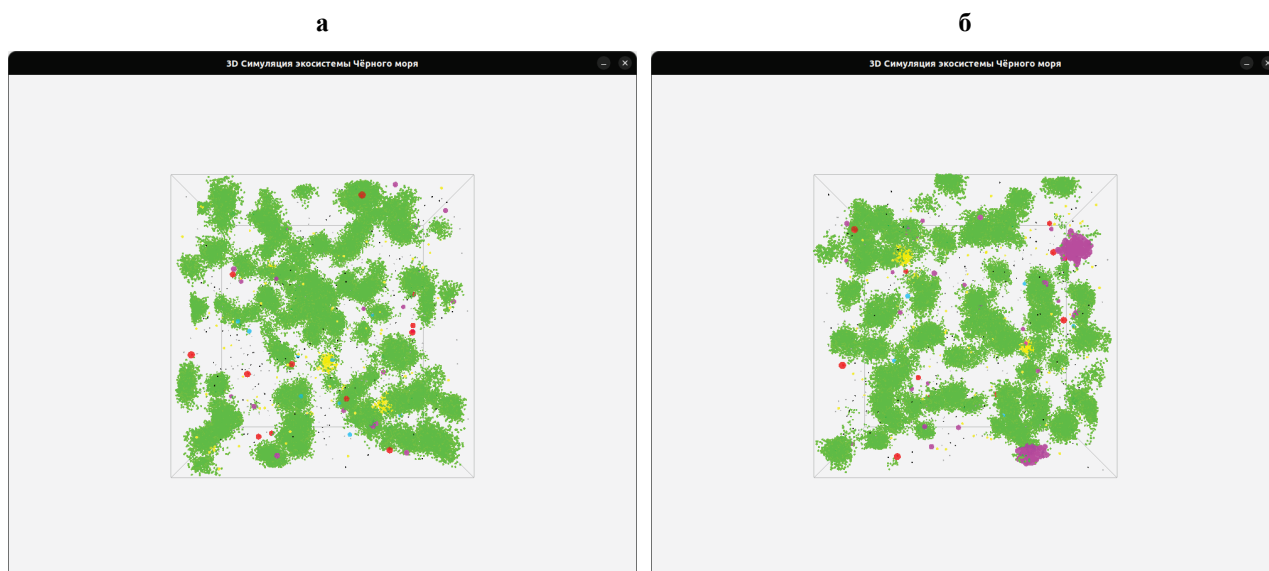


Рисунок 2. 3D реализации экологии Чёрного моря, а) образование первичных кластеров фитопланктона; б) выедание фитопланктона планктофагами

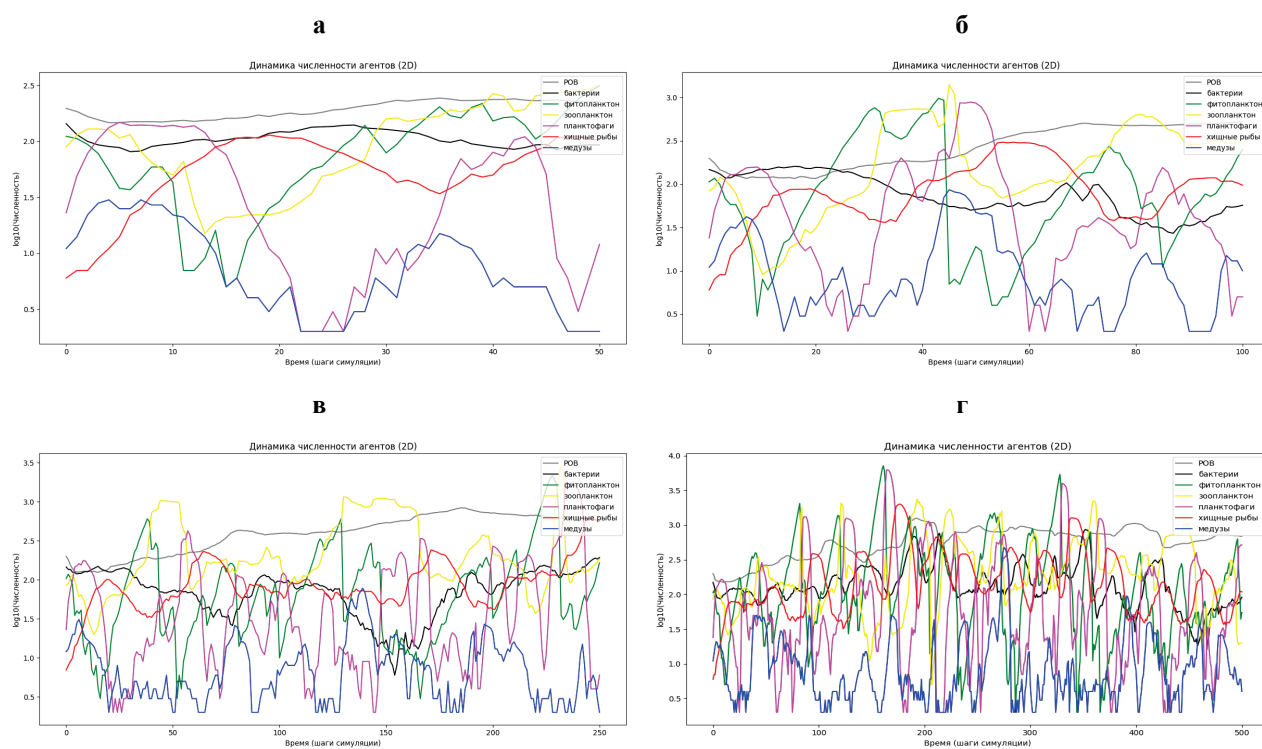


Рисунок 3. Динамика численности компонентов экосистемы в ходе симуляции, цветные линии соответствуют различным группам гидробионтов, время симуляции на графиках в 10 раз меньше программного времени

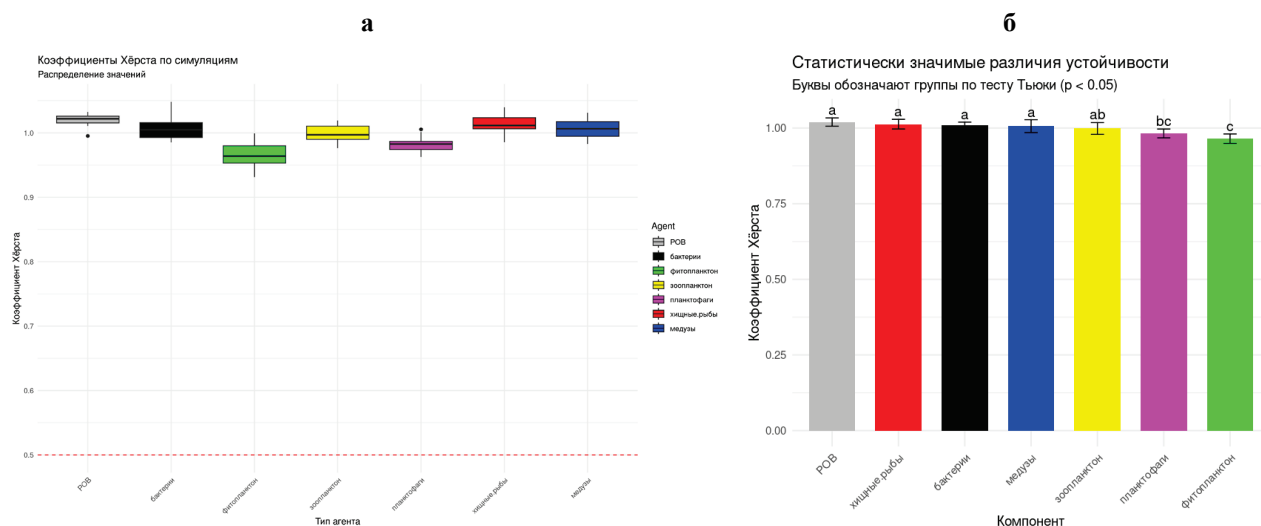


Рисунок 4. Статистически значимые различия коэффициента Хёрста между компонентами экосистемы для 1000 шагов симуляции, а) представление в виде ящиков с усами; б) столбцы с разными буквами значимо отличаются (тест Тьюки, $p < 0,05$)

ОБСУЖДЕНИЕ

Иерархия устойчивости компонентов. Полученные значения коэффициента Хёрста на 1000 шагах выполнения программы ($> 0,96$ для всех компонентов) свидетельствуют о сильной персистентности всей системы, что характерно для сложных взаимосвязанных экосистем с мощными обратными связями. Такие высокие значения H указывают на долгосрочную память системы – текущее состояние сильно зависит от предыдущих состояний, на наличие буферных механизмов, стабилизирующих экосистему, и на сильные нелинейные обратные связи между компонентами. Выявленная иерархия устойчивости соответствует принципу трофической каскадности, где стабильность высших трофических уровней обеспечивается буферной ёмкостью нижних уровней, и имеет чёткую экологическую интерпретацию: 1) **РОВ и бактерии** ($H \approx 1,01-1,02$) демонстрируют максимальную устойчивость, отражая стабильность базовых биохимических процессов. Эти компоненты служат фундаментом экосистемы, обеспечивая конверсию питательных веществ. 2) **Хищные рыбы и медузы** ($H \approx 1,00-1,01$) показали неожиданно высокую устойчивость. Для хищных рыб это может объясняться буферизацией через трофические уровни и способностью переключаться между разными источниками пищи. В реальных условиях их уязвимость выше, что требует дальнейших исследований. Высокая устойчивость желетелых объясняет их успешные инвазии в Чёрное море в 1980-1990-х годах [10,11]. 3) **Зоопланктон и планктофаги** ($H \approx 0,98-0,99$) занимают промежуточное положение, демонстрируя умеренную чувствительность к изменениям в нижних трофических уровнях. 4) **Фитопланктон** ($H = 0,96$) оказался наименее устойчивым компонентом, что соответствует его роли первичного продуцента, наиболее чувствительного к изменениям среды. Это согласуется с полевыми наблюдениями, показывающими высокую вариабельность цветения фитопланктона в ответ на внешние изменения [14].

Контринтуитивность больших систем. В сложных системах, таких как экосистема Чёрного моря (приложение 1), некоторые корреляционные связи кажутся контринтуитивными из-за нелинейных взаимодействий и запаздываний в ответах. Например, отрицательная корреляция между бактериями и РОВ отражает не просто прямое потребление, но и сложные обратные связи в биогеохимическом цикле. Также следует отметить, что модель может упрощать реальные трофические связи, что влияет на статистические взаимосвязи. Кроме того, запаздывания в динамике популяций, характерные для реальных экосистем, могут искажать корреляционные оценки в статическом анализе. Например, всплеск фитопланктона может приводить к последующему росту зоопланктона, но в статическом срезе это может проявиться как слабая или даже отрицательная корреляция из-за временного лага.

Сравнение с реальной экосистемой. Пространственно-временные паттерны, выявленные в модели, соответствуют наблюдаемым в Чёрном море. Кластеризация фитопланктона аналогична весенним цветениям, наблюдаемым в верхних слоях моря [15]. Волны численности соответствуют 3-4-летним циклам промысловых видов рыб [12]. Сукцессионные изменения с участием медуз отдалённо напоминают инвазию гребневика *Mnemiopsis leidyi* в 1980-х годах [10,11]. Высокая устойчивость бактериального сообщества подтверждается существованием микробной петли [13].

Теоретическое значение результатов. Полученные данные подтверждают концепцию "критической замедленности" (critical slowing down) как индикатора устойчивости экосистем [16]. Высокие значения H во всех компонентах системы свидетельствуют о её способности сопротивляться возмущениям, что характерно для зрелых экосистем с развитыми компенсаторными механизмами.

Ограничения модели. Модель ограничена малым множеством рассматриваемых видов, упрощением пространственной структуры, отсутствием сезонных факторов и внешних воздействий. В будущем следует учитывать более сложные механизмы взаимодействия и внешние факторы.

ВЫВОДЫ

1. Агентно-ориентированная модель успешно воспроизводит ключевые пространственно-временные паттерны Чёрного моря, включая кластеризацию, волны численности и сукцессию.
2. Высокие значения коэффициента Хёрста ($H > 0,96$) для всех компонентов свидетельствуют о сильной персистентности и устойчивости системы, что характерно для зрелых экосистем с развитыми буферными механизмами. Наименее устойчивым компонентом является фитопланктон, что подтверждает его чувствительность и роль индикатора экологического состояния.
3. Устойчивость желетелых ($H \approx 1$) объясняет их успешную инвазию и доминирование в условиях изменений.

Благодарности. Авторы выражают благодарность участникам научного семинара СевГУ Лесная школа IV "Сложные системы: от трихоплакса до экологии Гераклейского полуострова", 25.12.2024 за творческую атмосферу, ценные рекомендации и обсуждение, а также Б.Е. Аннинскому, Т.Н. Климовой и С.А. Царину за плодотворные дискуссии. Работа выполнена в соответствии с проектом Сириус.Лето и в рамках Госзаданий ФИЦ ИнБЮМ РАН по темам № 124030100100-0 и № 124022400152-1.

Список литературы / References:

1. Hastings A., Wysham D.B. Regime shifts in ecological systems can occur with no warning. *Ecology Letters*, 2010, vol. 13, no. 4, pp. 464-472.
2. Савицкий М.А., Кузнецов А.В. Фракционирование планктона с помощью последовательной фильтрации и построение пирамид биоразнообразия. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 1, с. 99-110 [Savitsky M.A., Kuznetsov A.V. Fractionation of plankton using sequential filtration and construction of biodiversity pyramids. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, vol. 8, no. 1, pp. 99-110 (In Russ.)].
3. Гладыш М., Челядина Н., Кузнецов А. Сообщество морского планктона как активная среда. *Биосфера*, 2025, т. 17, № 2, с. 83-107 [Gladyshev M., Chelyadina N., Kuznetsov A. Marine plankton community as an active environment. *Biosphere*, 2025, vol. 17, no. 2, pp. 83-107 (In Russ.)].
4. Калущ Ю.А., Логинов В.М. Показатель Херста и его скрытые свойства. *Сиб. журн. индустр. матем.*, 2002, т. 5, вып. 4, с. 29-37 [Kalush Yu.A., Loginov V.M. Hurst exponent and its hidden properties. *Sib. J. Ind. Math.*, 2002, vol. 5, iss. 4, pp. 29-37 (In Russ.)].
5. Ерохин В.Е. Растворенные углеводы некоторых биотопов прибрежной зоны моря. *Океанология*, 1972, т. 12, № 2, с. 291-298 [Erokhin V.E. Dissolved carbohydrates of some biotopes of the coastal zone of the sea. *Oceanology*, 1972, vol. 12, no. 2, pp. 291-298 (In Russ.)].
6. Clegg R.G. A practical approach to measuring the Hurst parameter. *International Journal of Simulation: Systems, Science & Technology*, 2006, vol. 7, no. 2, pp. 3-14.
7. McHugh M.L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochem Med (Zagreb)*, 2011, vol. 21, no. 3, pp. 203-209.
8. Переладов М.В. Некоторые наблюдения за изменением биоценозов Судакского залива Черного моря. *Тез.докл. III Всесоюз. конфер. по морской биологии*, 1988, с. 237-238 [Pereladov M.V. Some observations on changes in biocenoses of the Sudak Bay of the Black Sea. *Abstract of the report of the III All-Union Conference on Marine Biology*, 1988, pp. 237-238 (In Russ.)].
9. Ковалева И.В., Финенко З.З., Суслин В.В. Пространственная и временная динамика биомассы фитопланктона в поверхностном слое Черного моря. *Морской биологический журнал*, 2023, т. 8, № 4, с. 52-63 [Kovaleva I.V., Finenko Z.Z., Suslin V.V. Spatial and temporal dynamics of phytoplankton biomass in the surface layer of the Black Sea. *Marine Biological Journal*, 2023, vol. 8, no. 4, pp. 52-63 (In Russ.)].
10. Shiganova T.A. Invasion of the Black Sea by the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and recent changes in pelagic community structure. *Fish Oceanogr*, 1998, vol. 7, no. 3/4, pp. 305-310.
11. Финенко Г.А., Аннинский Б.Е., Дацык Н.А. *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (Ctenophora lobata) в прибрежных районах Черного моря 25 лет после вспышки. *Российский журнал биологических инвазий*, 2017, т. 10, № 4, с. 110-122 [Finenko G.A., Anninsky B.E., Datsyk N.A. *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 (Ctenophora lobata) in the coastal areas of the Black Sea 25 years after the outbreak. *Russian Journal of Biological Invasions*, 2017, vol. 10, no. 4, pp. 110-122 (In Russ.)].
12. Плошихина Е.А. Краткая биологическая характеристика европейского анчоуса (*Engraulis encrasicolus*) в северо-восточной части Черного моря. *Молодой ученый*, 2024, № 22 (521), с. 120-123 [Ploshikhina E.A. Brief biological characteristics of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the north-eastern part of the Black Sea. *Young scientist*, 2024, no. 22 (521), pp. 120-123 (In Russ.)].
13. Sorokin Y.I. *The Black Sea Ecology and Oceanography*. Publisher: Backhuys, 2002, 875 p.

14. Oguz T., Ediger D. Comparison of in situ and satellite-derived chlorophyll pigment concentrations, and impact of phytoplankton bloom on the suboxic layer structure in the western Black Sea during May-June 2001. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2006, vol. 53, no. 17-19, pp. 1923-1933.
15. Silkin V., Mikaelyan A.S., Pautova L., Fedorov A. Annual Dynamics of Phytoplankton in the Black Sea in Relation to Wind Exposure. *J. Mar. Sci. Eng.*, 2021, vol. 9, no. 12, p. 1435.
16. Scheffer M., Bascompte J., Brock W.A., Brovkin V., Carpenter S.R., Dakos V., Held H., van Nes E.H., Rietkerk M., Sugihara G. Early-warning signals for critical transitions. *Nature*, 2009, vol. 461, no. 7260, pp. 53-59.

ANALYSIS OF THE BLACK SEA ECOSYSTEM STABILITY BASED ON AGENT-BASED MODELING

Baranovsky A.A.¹, Kuznetsov A.V.^{1,2}

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: andrei_kouznetsov@hotmail.com

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

Nakhimov ave., Sevastopol, 299011, Russia

Received 12.07.2025

Abstract. This study presents a comprehensive stability analysis of the Black Sea ecosystem using agent-based modeling combined with time-series methods, including the Hurst exponent. The ecological model, implemented in Python with stochastic elements, simulates the dynamics of key ecosystem components: dissolved organic matter (DOM), bacteria, phytoplankton, zooplankton, planktivorous fish, predatory fish, and jellyfish. Results demonstrate the emergence of spatiotemporal patterns consistent with natural phenomena and reveal a hierarchical stability structure: foundational biogeochemical processes (DOM and bacteria) exhibit the highest resilience, while phytoplankton shows greater sensitivity to disturbances. High Hurst exponent values (>0.96) confirm strong system-wide persistence, validated through statistical criteria (ANOVA, Tukey HSD; $p < 0.001$). These findings indicate: 1) the Black Sea ecosystem possesses robust buffer mechanisms; 2) primary producers (phytoplankton) serve as critical indicators of ecosystem health; 3) agent-based modeling effectively captures complex ecological memory dynamics. The study advances methodologies for assessing marine ecosystem resilience and demonstrates the utility of agent-based models coupled with long-memory analysis for studying complex ecological systems.

Key words: *agent-based modeling, system resilience, time-series analysis, Hurst exponent, Black Sea, marine ecology.*